



MAGDA SOFIA
FALÉ ALMAS

FORMAÇÃO EM CONTEXTO DE TRABALHO EM LABORATÓRIO DA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Relatório de estágio do Mestrado em Engenharia
Biológica e Química

ORIENTADOR

Professora Doutora Ana Gabriela Gomes

SUPERVISOR

Dr. Mário Patrício

Julho de 2021

MAGDA SOFIA
FALÉ ALMAS

**FORMAÇÃO EM CONTEXTO DE
TRABALHO EM LABORATÓRIO DA
INDÚSTRIA FARMACÊUTICA**

JÚRI

Presidente: Professora Doutora Maria de Lurdes de Figueiredo Gameiro, ESTBarreiro/IPS

Supervisor: Dr. Mário Patrício, Generis Farmacêutica, S.A.

Vogal: Professora Doutora Ana Margarida Pires de Azevedo, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa

Julho de 2021

AGRADECIMENTOS

A execução deste relatório e a realização do estágio foi possível com apoio de pessoas importantes, por isso aqui ficam os agradecimentos.

Gostaria de dirigir os meus sinceros agradecimentos a todos os elementos da empresa Generis Farmacêutica SA. e do Laboratório de Controlo de Qualidade. Agradecer a toda a equipa das matérias-primas que me acolheram durante o período de estágio e pelos ensinamentos que me transmitiram.

À professora Maria Gameiro, coordenadora do Mestrado em Engenharia Biológica e Química por toda a ajuda prestada.

À professora Ana Gabriela Gomes, pela forma como me orientou e ajudou na realização do relatório.

À Escola Superior de Tecnologia do Barreiro, do Instituto Politécnico de Setúbal, respetivos docentes e funcionários, por tudo o que me proporcionaram ao longo destes cinco anos, desde a licenciatura, a todos os níveis.

Aos meus colegas de curso, o meu muito obrigado pelo apoio e companheirismo.

À minha amiga Mónica pela paciência, apoio e aprendizagem ao longo dos cinco anos de licenciatura e mestrado.

Aos meus pais pela motivação, por acreditarem sempre em mim e fazerem o possível e impossível para eu chegar onde me encontro. À minha família, gostaria de agradecer pela compreensão por não ter estado com eles todas as vezes que desejávamos e pelo apoio e força que me deram ao longo desta caminhada.

O meu muito obrigado a todos!

RESUMO

O presente relatório descreve as atividades desenvolvidas no âmbito do estágio curricular do Mestrado em Engenharia Biológica e Química na Escola Superior de Tecnologia do Barreiro e decorreu na Indústria Farmacêutica Generis, S.A., de março a julho de 2021. O estágio tinha como objetivo, permitir aplicar os conhecimentos teóricos adquiridos, em contexto real, dando à discente as competências necessárias.

Neste estágio, a discente aprendeu a trabalhar sob as regras de Boas práticas de fabricação/ Good Manufacturing Practices (GMPs) que descrevem o padrão mínimo de que um fabricante de medicamentos deve atender nos seus processos de produção e controlo de qualidade para garantir que são feitos de forma consistente e com a qualidade exigida. A discente aprendeu também a trabalhar sob as regras de Boas práticas de laboratório/Good Laboratory Practices (GLP's) que constituem conjunto de regras e critérios para um sistema de qualidade relacionado com as condições sob as quais os ensaios que asseguram o controlo de qualidade de todos os produtos que entram e saem de uma fábrica são realizados, monitorizados, registados, relatados e arquivados.

Com o objetivo de garantir a qualidade das matérias-primas, foram realizados ensaios físico-químicos, obtendo-se resultados dentro da especificação ou conformes. Quando esta condição não se verificou, foram executados os procedimentos adequados a cada ensaio de forma a ultrapassar ou não, esse resultado fora de especificação.

Os ensaios realizados no laboratório de Controlo de qualidade foram ensaios de aparência, solubilidade, de identificação por espectroscopia de IV (Infravermelho), ensaios para determinação do teor de água através dos seguintes métodos: titulação de Karl Fischer e perda por secagem/loss on drying (LOD), cinzas sulfúricas e totais, cloretos e sulfatos, titulação por potenciometria e cromatografia líquida de alto desempenho (para quantificar o princípio ativo e impurezas conhecidas e desconhecidas). O perfil de impureza deve ser comparado com dados históricos ou do fabricante a fim de detetar alterações no API resultantes de modificações nas matérias-primas, parâmetros operacionais do equipamento ou processo de produção.

A discente participou nas atividades de gestão do laboratório que incluiu gestão dos padrões usados nos vários ensaios, reagentes e amostras. Para além disso, ainda participou nas atividades de melhoria contínua desenvolvidas pelo laboratório com âmbito na filosofia *Kaizen* que visa o aumento de produtividade, otimização dos equipamentos, melhoria da organização dos espaços e eliminação de desperdícios.

Neste estágio, foram obtidos resultados conformes e não conformes, permitindo a aquisição de conhecimentos acerca das práticas realizadas em caso de ocorrência de resultados fora de especificação.

PALAVRAS-CHAVE: MATÉRIAS-PRIMAS, GOOD MANUFACTURING PRACTICES, GOOD LABORATORY PRACTICES, CONTROLO DE QUALIDADE, ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

ABSTRACT

This report describes the activities developed in the curricular internship of the master's degree in Biological and Chemical Engineering, carried out in Pharmaceutical Industry Generis, S.A from March to June 2021. The aiming of this the internship is to allow the application of the theoretical knowledge acquired, in a real context, giving the student the necessary skills.

During this period, the student learned to work in the light of some standard practices, used to ensure a quality system. The Good Manufacturing Practices (GMPs), which aim to describe the minimum standard that a medicine manufacturer must meet in its production processes and the Good Laboratory Practices (GLPs), which aim to describe a set of rules and criteria related to the planning, conduct, monitoring, recording, reporting and archiving of non-clinical health studies, as well as the development of tests that ensure the quality control of all products that enter and leave the factory.

In order to guarantee the quality of raw materials, physicochemical tests were performed, obtaining results within specification or in compliance. When this condition was not verified, all the correct procedures were followed for each test.

The tests performed were, appearance tests, solubility and identification tests by IR spectroscopy (Infra-red). For the determination of the water content, other tests were performed, such as Karl Fischer titration and loss on dry (LOD), sulphuric and total ash, chlorides and sulphates, dosage by potentiometry and high-performance liquid chromatography (HPLC). All the assays were performed as a quantification of the active principle, as well as known and unknown impurities. The impurity profile must be with historical or manufacturer's data in order to detect changes in the API resulting from modifications in the raw materials, equipment operating parameters or production process.

Besides the physicochemical tests, the student participated in laboratory management and continuous improvement activities, developed by the laboratory, based on the "Kaizen" philosophy. The activities included the management of the standards used in the various tests, reagents and samples, as well as, the increase of productivity, optimisation of the equipment, improvement of the organisation of the spaces and elimination of waste, respectively.

In this internship, compliant and non-compliant results were obtained, enabling the acquisition of knowledge about the standard practices carried out in both situations.

KEYWORDS: RAW MATERIALS, GOOD MANUFACTURING PRACTICES, GOOD LABORATORY PRACTICES, QUALITY CONTROL, PHYSICOCHEMICAL TESTS

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Indústria Farmacêutica Generis, S.A.	2
1.2. Objetivos do estágio	6
1.3. Cronograma.....	6
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	7
2.1. Gestão de Qualidade.....	7
2.2. Controlo de Qualidade	8
2.3. Medicamentos Genéricos	9
2.3.1. Matérias-primas.....	10
2.4. Qualidade dos medicamentos genéricos	10
2.5. Farmacopeia Europeia	11
2.6. Técnicas usadas no laboratório de CQ	11
2.6.1. Cromatografia Líquida de elevado desempenho (HPLC)	11
2.6.2. Titulação Karl-fischer	17
2.6.3. Titulação potenciométrica	19
3. METODOLOGIA	20
3.1 Ensaio da aparência (Monografia 2.2.2.)	20
3.2 Ensaio de solubilidade (Monografia 1.4.)	20
3.3 Ensaio espectroscopia infravermelho (Monografia 2.2.24.)	21
3.4 Ensaio perda por secagem/Loss on drying (Monografia 2.2.32.)	23
3.5 Titulação Karl Fischer (Monografia 2.5.12.)	23
3.6 Ensaio cinzas Totais (Monografia 2.4.16.)	24
3.7 Ensaio cinzas sulfúricas (Monografia 2.4.14.).....	25
3.8 Sulfatos (monografia 2.4.13.).....	25
3.9 Cloretos (monografia 2.4.4.)	25
3.10 Ensaio de doseamento por potenciometria (Monografia 2.2.20.)	26
3.11 Ensaio de HPLC (Monografia 2.2.29.)	27
4. ANÁLISE E TRATAMENTO DE DADOS	30
1.1. Ensaio espectroscopia infravermelho	30

1.2. Ensaio de cromatografia líquida do elevado desempenho	32
5. DISCUSSÃO.....	43
6.CONCLUSÃO	44
7.CONCLUSION.....	45
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
7. ANEXOS.....	49
Anexo 1	49
Anexo 2	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Logótipo da empresa [1]	2
Figura 2 - Linha cronológica da empresa Generis [1].....	2
Figura 3 - Edifício da unidade industrial [3]	3
Figura 4 - Mercado alvo da Generis [4].....	4
Figura 5 - Constituição do equipamento de HPLC [14]	12
Figura 6 – Cromatogramas com ordem dos tempos de retenção para cada tipo de cromatografia [15].....	13
Figura 7 - Influência de N na resposta da coluna cromatográfica [17].....	14
Figura 8 - Fórmula do modelo do prato teórico. A fórmula da direita é referente aos picos Gaussianos [17].....	14
Figura 9 - Equação do tempo de retenção de um componente da amostra [18]	15
Figura 10 – Equação que exprime a seletividade [17].....	15
Figura 11 - Relação entre largura do pico e separação [17].....	16
Figura 12 - Fórmula do fator de simetria	16
Figura 13 - Razão peak-to-valley [20]	17
Figura 14 - Titulação Karl Fischer volumétrica [21]	18
Figura 15 - Gráfico de potencial versus volume de titulante [21]	19
Figura 16 - Espectrofotómetro FT-IR modo transmissão [25].....	22
Figura 17 - Espectrofotómetro FT-IR modo ATR [25].....	22
Figura 18 - Equipamento de titulação de Karl-Fischer [26].....	24
Figura 19 - Equipamento de potenciometria por titulação [26]	26
Figura 20 - Equipamento de HPLC legendado [27].....	27
Figura 21 - Espectro NIR com resultado não conforme obtido do método ATR	30

Figura 22 - Espectro NIR com resultado conforme obtido do método ATR 31

Figura 23 - Cromatograma obtido do ensaio de substâncias relacionadas do API 32

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Cronograma das atividades desenvolvidas no decorrer do estágio na Generis SA. no período de estágio de março a julho de 2021.	7
Tabela 2 - Significados de cada termo usado no ensaio da solubilidade (Monografia 1.4.)	21
Tabela 3 - Preparação das amostras nos dois métodos de espectroscopia de IV	22
Tabela 4 - Condições cromatográficas necessárias ao ensaio	28
Tabela 5 - Resultados referentes à área, média e RSD obtidos na reta para cada impureza conhecida e para o API do ensaio de substâncias relacionadas	33
Tabela 6 - Resultados da recuperação do padrão de recuperação para cada impureza e API.....	34
Tabela 7 - Valores obtidos de amount comparados com o limite do LOQ	35
Tabela 8 - Média das áreas obtidas em cada injeção da reta e o RSD.....	36
Tabela 9 - Média das áreas obtidas em cada injeção da reta e o RSD na nova sample set	39
Tabela 10 - Média das áreas obtidas em cada reinjeção da reta e o RSD	39
Tabela 11 - Resultados finais da OOS.....	40

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

API - Princípio ativo/ Active pharmaceutical ingredient

CoA - Certificado de Análise

CQ - Controlo de Qualidade

EMA - Agência Europeia de Medicamento

GMPs – Boas práticas de manufactura/Good Manufacturing Practices

GLP's – Boas práticas de laboratório/Good Laboratory Practices

HPLC - Cromatografia Líquida de Alto desempenho

IV – Infravermelho

I&D - Investigação e Desenvolvimento

IPS - Instituto Politécnico de Setúbal

KARL FISCHER - Karl Fischer

LOD - Loss on Drying/Perda por secagem

LOQ - Limite de Quantificação

MPs - Matérias-primas

Ph. Eur./EP - Farmacopeia Europeia

OOS – Fora de especificação/Out-of-Specification

RA - Registo de Análise

RSD - Desvio Padrão Relativo

UV – Ultravioleta

UC - Unidade Curricular

1. INTRODUÇÃO

O presente estágio foi realizado na Indústria Farmacêutica Generis, S.A. mais especificamente no laboratório de controlo de qualidade (CQ) na equipa das Matérias-primas (MPs), no âmbito da unidade curricular (UC) de Estágio Curricular do Mestrado em Engenharia Química e Biológica da Escola Superior de Tecnologia do Barreiro (ESTB), Instituto Politécnico de Setúbal (IPS). O mesmo teve início no dia 8 de março e terminou no dia 9 de julho do mesmo ano.

Ao longo de todo o processo de fabrico dos diversos medicamentos, existem vários pontos onde é necessário garantir o controlo de qualidade, desde as matérias-primas, ao produto semi-acabado e produto acabado.

As matérias-primas são verificadas, de forma a verificar-se se encontraram em condições (dentro da especificação) de serem utilizadas na produção. Essa especificação é definida como uma lista de testes, referências a procedimentos analíticos e critérios de aceitação apropriados, que são limites numéricos ou outros critérios com os quais as matérias-primas devem estar em conformidade para serem consideradas aceitáveis.

Os ensaios realizados no laboratório de controlo de qualidade avaliam parâmetros, tais como características químicas e físicas, e verifica-se se a matéria-prima está dentro do intervalo admitido para esses parâmetros de acordo com a farmacopeia.

Existem ainda outras funções no laboratório de CQ, tais como atividades relacionadas com o fluxo de entrada das amostras no laboratório, atividades de verificação de dados gerados pelos analistas para emissão de certificados de análise, atividades de limpeza de material e das várias áreas do controlo de qualidade e coordenação e planeamento de atividades de controlo de qualidade de maneira que haja garantia de que há controlo sobre todos os materiais e produtos processados na empresa.

1.1. INDÚSTRIA FARMACÊUTICA GENERIS, S.A.

A Farmacêutica Generis SA., é um Laboratório Farmacêutico Português, especializado no mercado de medicamentos genéricos e similares, para além de os desenvolver e produzir [1].



Figura 1 - Logótipo da empresa [1]

1.1.1. HISTÓRIA

O desenvolvimento ao longo do tempo desta empresa encontra-se no esquema da Figura 2 [1].

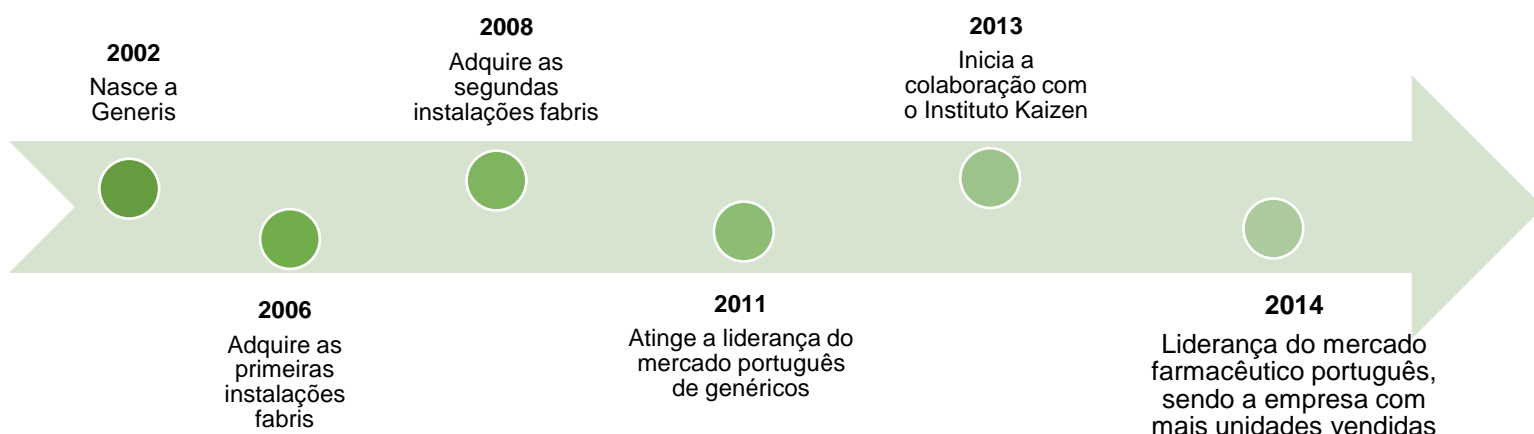


Figura 2 - Linha cronológica dos eventos mais marcantes no desenvolvimento da empresa Generis [1]

Atualmente, a Generis faz parte do Grupo Aurobindo, presente em mais de 20 países, integrado desde a Investigação e Desenvolvimento (I&D) à comercialização de medicamentos genéricos [1].

1.1.2. ATIVIDADE COMERCIAL

A Generis, S.A. tem um portefólio abrangente, que alcança 85% das áreas terapêuticas, constituído por 1492 medicamentos sujeitos a receita médica, 254 produtos de uso hospitalar e 67 Produtos de Saúde. São produzidos antibióticos, dermatológicos, oncológicos, antirretrovirais, antialérgicos, entre outros [2].

1.1.3. ATIVIDADE INDUSTRIAL

A unidade industrial da Generis (Figura 3), localiza-se na Venda Nova, Amadora, Portugal e está em funcionamento desde 2006. Tem capacidade para produzir anualmente 30 milhões de embalagens. Esta unidade industrial tem 8.125 metros quadrados de área útil, divididos entre produção, área de análise, escritórios e zona de armazenamento [3].



Figura 3 - Edifício da unidade industrial [3]

São fabricados atualmente mais de 800 referências diferentes de produto acabado. A empresa está localizada numa área com acesso privilegiado às principais vias de comunicação, para fácil receção de matéria-prima e expedição do produto acabado [3].

A empresa possui a área de desenvolvimento para a realização de lotes laboratoriais ou lotes piloto equipada com equipamentos de produção à escala de 10% dos equipamentos industriais existentes, permitindo o *scale-up* industrial minimizando os riscos [3].

1.1.4. EXPORTAÇÃO

A Farmacêutica Generis está presente nos mercados de Angola, Cabo Verde, Moçambique e Macau, por serem de língua portuguesa e existirem relações bilaterais históricas entre os países [4].

Está presente ainda no Médio Oriente, nomeadamente, Líbano, Líbia e Iraque através de parcerias estratégicas com agentes e distribuidores locais. Nos continentes americanos e asiáticos, já existem produtos registados de medicamentos e a sua comercialização [4].

Na Figura 4 encontram-se representados os países que constituem o mercado alvo da Generis SA [4].



Figura 4 - Mercado alvo da Generis [4]

Para a empresa é importante fornecer medicamentos da mais elevada qualidade e isso requer um laboratório de qualidade que assegure esse objetivo.

1.1.5. Laboratório Controlo de Qualidade

A discente estagiou no laboratório de controlo de qualidade (CQ). O laboratório de CQ tem como principais funções:

- análise e libertação de lotes para a união europeia
- está equipado com tecnologias de análise, para atender a qualquer exigência de farmacopeias internacionais
- todas as atividades relacionadas à qualidade são registadas no momento em que são realizadas
- qualquer desvio do procedimento escrito é documentado e explicado.
- nenhum material deve ser libertado ou usado antes da conclusão satisfatória da avaliação feita pela(s) unidade(s) de qualidade [3].

No laboratório de CQ existem diversas equipas essenciais aos vários pontos de controlo durante o processo de fabrico que são:

- Equipa da microbiologia,
- Equipa do produto acabado,
- Equipa dos novos produtos,
- Equipa da estabilidade,
- Equipa das amostragens,
- Equipa do fluxo de amostras
- Equipa das matérias-primas.

A discente teve a oportunidade de integrar a equipa das Matérias-Primas (MPs), durante o estágio curricular. Realizou-se ensaios de espectroscopia de IV (Infravermelho), com recurso a um espectrofotómetro de IV, e também ensaios para determinação do teor de água através dos seguintes métodos: titulação de Karl Fisher e perda por secagem/loss on drying (LOD).

Para além destes ensaios, a discente teve a oportunidade de realizar diversos ensaios físico-químicos tais como determinação de cloretos, sulfatos, aparência e solubilidade. cinzas sulfúricas, cinzas totais titulação por potenciometria para determinação direta do princípio ativo (API) da amostra e técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) em matérias-primas para quantificar o princípio ativo, impurezas conhecidas e desconhecidas.

A análise das MPs após a sua receção no armazém, inclui o envio para o laboratório de CQ acompanhado com o código referente a um sistema informático (código SAP), o número do lote, documentação do fabricante e também da documentação interna de receção e amostragem. As MPs podem encontrar-se em cinco estados de urgência:

- Produtos urgentes a aguardar a amostragem;
- Produtos urgentes com ensaios fundamentais terminados;
- Produtos com ensaios em falta para terminar análise;
- Produtos para verificação de resultados;
- Produtos verificados a aguardar emissão do Certificado de Análise (CoA).

Todas estas categorias encontram-se num quadro que é atualizado diariamente pelo supervisor e utilizado por todos os analistas da equipa das MPs. Os ensaios são registados no caderno de laboratório referente à matéria-prima analisada e, uma vez concluídos todos os ensaios, os resultados são colocados no Registo de Análise (RA).

Os registos realizados nos cadernos de laboratório devem conter dados completos derivados de todos os testes realizados para garantir a conformidade:

- Descrição da amostra recebida
- Referência a cada método de teste usado
- Peso ou medida da amostra para cada teste, bem como gráficos, espectros ...
- Registo de todos os cálculos do tratamento de resultados
- Indicação dos equipamentos usados
- Resultados e conformidade com os critérios de aceitação
- Assinatura da pessoa que executou com a data de execução.

A equipa de verificação procede à correção e confirma se está tudo conforme para permitir a emissão do CoA (certificado de análise) e é feita a aprovação final.

1.2. OBJETIVOS DO ESTÁGIO

Este estágio teve como objetivos:

- Trabalhar segundo as boas práticas de fabricação (GMP) e as boas práticas de laboratório (GLP)
- Conhecer o funcionamento de um Laboratório de Controlo da Qualidade na Indústria Farmacêutica
- Realização de ensaios físico químicos em matérias-primas, tais como, de aparência, solubilidade, espectroscopia infravermelho para comparação do espectro da amostra com o padrão de referência, perda por secagem, titulação Karl fischer, cinzas totais, cinzas sulfúricas, titulação por potenciometria e cromatografia líquida de elevado desempenho.
- Conhecer os procedimentos a seguir em caso de ocorrência de resultados fora de especificação (não conforme), bem como dentro das especificações (conforme)
- Compreender as atividades de gestão de laboratório (gestão de padrões, reagentes e amostras).

1.3. CRONOGRAMA

O estágio iniciou-se a 8 de março e terminou a 9 de julho de 2021, perfazendo um total de 600 horas. No cronograma (Tabela 1), estão indicadas as atividades desenvolvidas durante o estágio.

Tarefa 1 – Leitura da documentação GMPs e introdução ao laboratório

Tarefa 2 – Realização técnicas analíticas das matérias-primas por espectroscopia de infravermelho, perda por secagem, determinação da percentagem de água pela técnica de titulação de Karl-fischer.

Tarefa 3 – Aplicação de HPLC para quantificação do princípio ativo, impurezas conhecidas e desconhecidas

Tarefa 4 – Realização de técnicas analíticas físico-químicas das matérias-primas, tais como, aparência, solubilidade, cloretos, sulfatos e cinzas

Tarefa 5 – Realização de técnica analítica das matérias-primas por titulação por potenciometria

Tabela 1 - Cronograma das atividades desenvolvidas no decorrer do estágio na Generis SA. no período de estágio de março a julho de 2021.

Tarefa	Semanas																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1																							
2																							
3																							
4																							
5																							

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. GESTÃO DE QUALIDADE

A Gestão da Qualidade abrange todas as questões que influenciam individual ou coletivamente na qualidade de um produto. Pode ser definida como o somatório dos procedimentos organizados com o objetivo de garantir que os medicamentos tenham a qualidade exigida para o uso a que se destinam. A Gestão da Qualidade, incorpora as Boas Práticas de Fabricação (do inglês, Good manufacturing Practices – GMP) [5].

As GMPs são a parte da Gestão da Qualidade que garante que os produtos são produzidos e controlados de forma consistente de acordo com os padrões de qualidade apropriados e estipulados para o uso pretendido. O termo “Fabricação” é definido para incluir todas as operações de recebimento de materiais, produção, embalagem, rotulagem, controle de qualidade, liberação, armazenamento, distribuição dos princípios ativos (APIs) e todas as fases de controle [5].

Os requisitos básicos das GMP são:

- Todos os processos de fabricação são claramente definidos de maneira a serem capazes de fabricar os fármacos de forma consistente com a qualidade exigida e em conformidade com suas especificações;
- As etapas críticas dos processos de fabricação e mudanças significativas no processo são sujeitas a validação;

Todas as condições necessárias para GMP são fornecidas, incluindo:

- O treino e qualificação pessoal;
- As instalações e espaço adequados;
- Os equipamentos e serviços adequados;
- Os materiais, recipientes e rótulos corretos;

- Os procedimentos e instruções aprovadas, de acordo com o Sistema de Qualidade Farmacêutica;
- O armazenamento adequado;
- As instruções e procedimentos são escritos de forma clara;
- Os procedimentos são realizados corretamente e os operadores são treinados para essa finalidade [5].

A qualidade deve ser da responsabilidade de todas as pessoas envolvidas na fabricação e no controlo. O sistema de gestão da qualidade deve abranger a estrutura organizacional, procedimentos e recursos, bem como as atividades necessárias para garantir a confiança de que o API atenderá às especificações pretendidas de qualidade e pureza. Todas as atividades relacionadas à qualidade devem ser definidas e documentadas [5].

2.2. CONTROLO DE QUALIDADE (CQ)

O CQ constitui a parte integrante das GMP destinada à amostragem, especificações das matérias-primas, com os testes, organização, documentação e procedimentos de libertação. Garantem que os testes necessários e relevantes são realmente efetuados e que as matérias-primas não são libertadas para uso, nem produtos colocados à venda, até que a sua qualidade seja devidamente comprovada [5].

Os requisitos básicos do CQ são:

- Os métodos dos testes são validados pelo controlo de qualidade;
- Os registos são feitos, manualmente e/ou por instrumentos de registo, que demonstram que todos os procedimentos de amostragem, inspeção e testes necessários foram realmente realizados. Quaisquer desvios são totalmente registados e investigados;
- A avaliação do produto inclui uma revisão e avaliação da documentação de produção relevante e uma avaliação dos desvios dos procedimentos especificados;
- Nenhum lote de produto é libertado para venda ou fornecimento antes da certificação por uma Pessoa Qualificada normalmente pertencente à garantia de qualidade;
- São guardadas as amostras de referência em quantidade suficientes de matérias-primas e produtos para permitir o exame futuro dessas amostras, quer seja uma repetição para provar os resultados já emitidos ou para efetuar testes de estabilidade [5].

2.2.1. Garantia de qualidade versus Controlo de qualidade:

A garantia de qualidade consiste na “parte da gestão da qualidade focada em fornecer confiança de que os requisitos de qualidade serão atendidos”. A confiança fornecida pela garantia de qualidade é dupla - internamente para a gestão e externamente para clientes, autoridades reguladoras, certificadores e terceiros. O controlo de qualidade pode ser definido como as técnicas operacionais e atividades usadas para cumprir os requisitos de qualidade [5].

2.3. MEDICAMENTOS GENÉRICOS

Um medicamento (forma farmacêutica) é um produto farmacêutico, tecnicamente elaborado, contendo um ou mais fármacos associados a outras substâncias, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico. Tem eficácia, segurança e qualidade comprovadas [6].

As formas farmacêuticas podem ser apresentadas em vários estados físicos, tais como, líquidas (soluções, xaropes, elixires, suspensões, emulsões, gotas, injetáveis, etc.), sólidas (comprimidos, drágeias, cápsulas, pós, pastilhas, granulados, supositórios, óvulos, etc.), semi-sólidas (pomadas, cremes, pastas, unguentos, etc.) e gasosas (aerossóis e inalantes) [6].

Segundo o Estatuto do Medicamento, um medicamento genérico tem a mesma composição qualitativa e quantitativa em substâncias ativas, a mesma forma farmacêutica e dose ou concentração, tendo bioequivalência com o medicamento de referência demonstrada por estudos de biodisponibilidade apropriados.

Um teste da bioequivalência é um estudo clínico feito num centro de estudos responsável por demonstrar a existência da mesma quantidade de substâncias ativas no organismo humano sempre que é tomada a mesma dose de um medicamento inovador ou do seu genérico. Tem a mesma indicação terapêutica que o medicamento inovador, de marca, tendo demonstrado que atua no organismo humano da mesma forma que o medicamento de referência [6].

Durante os primeiros anos de comercialização, os medicamentos inovadores são protegidos por patentes, sendo uma forma de garantir a exclusividade e a recuperação do dinheiro gasto na investigação do novo produto. Os genéricos são produzidos legalmente depois da patente dos medicamentos inovadores terminar [7].

Todos os medicamentos, incluindo os medicamentos genéricos, são fabricados em instalações que cumprem as normas legais em vigor e que são inspecionadas periodicamente pelas autoridades [7].

2.3.1. MATÉRIAS-PRIMAS

Entende-se por matéria-prima, qualquer substância, ativa ou não, utilizada na produção de um medicamento, quer permaneça inalterável quer se modifique ou se consuma no decurso do processo. As matérias-primas, incluem, assim, os excipientes e o princípio ativo [8].

Por princípio ativo (API) entende-se, por uma substância ou mistura de substâncias que quando utilizada no fabrico do medicamento, se torna um princípio ativo desse medicamento, destinado a exercer uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica, para restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas ou a estabelecer um diagnóstico médico [8] [9].

O excipiente engloba qualquer componente de um medicamento, com a exceção da substância ativa e do material da embalagem [8].

2.4. QUALIDADE DOS MEDICAMENTOS GENÉRICOS

A autorização de introdução no mercado de medicamentos genéricos está sujeita às mesmas disposições legais dos outros medicamentos de referência, apenas com a exceção da apresentação dos relatórios sobre ensaios farmacológicos, toxicológicos e clínicos. É obrigatória a demonstração da bioequivalência com base em estudos de biodisponibilidade ou quando estes não forem adequados, a demonstração ou equivalência terapêutica por meio de estudos de farmacologia clínica apropriados (estes testes seguem estritamente o disposto nas normas comunitárias) [6].

O sistema regulador europeu de medicamentos, é constituído por uma rede de cerca de cinquenta autoridades regulamentares dos trinta e um países do Espaço Económico Europeu (vinte e oito Estados Membros da União Europeia, Islândia, Liechtenstein e Noruega), pela Comissão Europeia e pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA), que asseguram aos utentes da União Europeia acesso a medicamentos seguros, eficazes e de qualidade [10].

Os ensaios necessários realizar para a libertação de um produto farmacêutico ou MP estão resumidos em códigos chamados farmacopeias.

São usadas quer pelas autoridades de Saúde Pública, quer por os fabricantes de medicamentos, de substâncias ativas e de excipientes [10].

2.5. FARMACOPEIA EUROPEIA

A Farmacopeia Europeia (Ph. Eur.) é uma obra de referência única para o controlo de qualidade de medicamentos. Os padrões oficiais que contém fornecem uma base científica para o controlo de qualidade durante todo o ciclo de vida de um produto [11]. Para além disso é uma farmacopeia regional publicada pela Direção Europeia da Qualidade dos Medicamentos e Cuidados de Saúde. A função primordial da Farmacopeia Europeia é proteger a Saúde Pública, constituir uma garantia da qualidade para os medicamentos de uso humano e facilitar a livre circulação dos medicamentos no espaço europeu [10]. Esta obra contém várias monografias gerais para o fabrico de medicamentos, métodos gerais de análise de substâncias e medicamentos e alguns requisitos gerais para as formas farmacêuticas [12].

2.6. TÉCNICAS USADAS NO LABORATÓRIO DE CQ

2.6.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ELEVADO DESEMPENHO (HPLC)

A cromatografia líquida do elevado desempenho (High performance Liquid Chromatography- HPLC), também conhecida como cromatografia líquida de alta performance, é o método mais usado na indústria farmacêutica para avaliar uma dada matéria-prima como o API e as impurezas conhecidas e desconhecidas [13] [14].

No laboratório de controlo de qualidade é usada esta técnica analítica para fazer dois ensaios específicos aos API's. Realiza-se o doseamento para quantificar o API e as substâncias relacionadas que quantificam todas as impurezas características do API. Estas impurezas podem ser idênticas ao API e apenas apresentam pequenas modificações (na estrutura química) devido a processos de degradação, ao processo de fabrico do API ou originadas pelo processo de mistura do API. Se essas substâncias relacionadas forem quimicamente relevantes ou perigosas também têm de ser controladas.

O API é quantificado no ensaio de doseamento e pode ser usado para quantificar impurezas no ensaio de substâncias relacionadas. Para este último caso a concentração do API, normalmente, é igual à concentração do limite da especificação para facilitar os cálculos no ensaio para a determinação de impurezas. A quantificação das impurezas, tanto para impurezas conhecidas como para desconhecidas, deve ser feita num limite controlado e inferior ao estabelecido, o Limite de Quantificação (LOQ) que será explicado mais à frente.

O equipamento de HPLC (Figura 5) é constituído por:

- um reservatório para a fase móvel;
- uma bomba para controlar o fluxo de amostra e de fase móvel que passa pela fase estacionária;
- um injetor que permite a introdução da amostra no fluxo da fase móvel antes de entrar na coluna;
- uma coluna que contém a fase estacionária e que quando entra em contato com a fase móvel permite a separação de vários analitos;
- um ou mais detetores (UV, condutividade. . .) para monitorizar e registar a absorbância num comprimento de onda específico e acoplado a este um sistema de aquisição e controlo de dados que controla todos os parâmetros do HPLC e adquire dados provenientes do detetor [14].

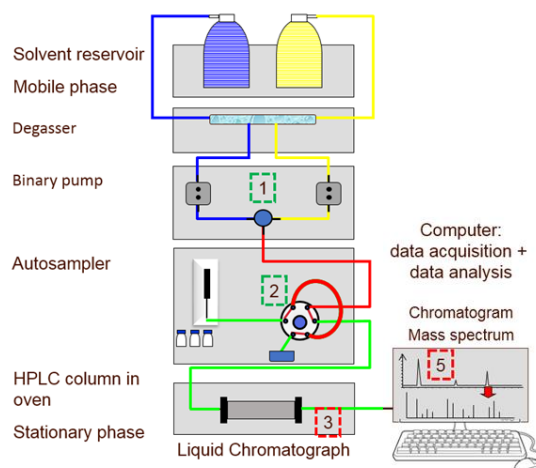


Figura 5 – Constituição base de um do equipamento de HPLC [14]

A coluna é normalmente feita de aço inoxidável, com um enchimento de partículas de tamanho muito reduzido que podem ir de 3 a 10 μm (fase estacionária). As colunas de HPLC normalmente são descritas com base no seu empacotamento, no tamanho da partícula e do poro, na altura e no diâmetro da própria coluna. A(s) fase(s) móvel(eis) é(são) fase(s) líquida(s) que flui(em) através da fase estacionária transportando os analitos. A composição da fase móvel depende da fase estacionária, e da natureza dos compostos a ser analisados.

A fase móvel pode ser uma mistura de dois/três solventes de modo a ajustarem a polaridade. A fase móvel é forçada a fluir pela coluna por auxílio de uma bomba de modo a superar a resistência ao escoamento da fase móvel [15].

A polaridade da fase estacionária irá definir o tipo de cromatografia a realizar. Se a fase estacionária for polar e a fase móvel apolar, a cromatografia define-se como Cromatografia

de Fase Normal (Figura 6). É mais usada quando os analitos são muito polares. Os solventes utilizados na fase móvel são Hexano, Heptano, clorofórmio, Eter isopropílico, THF (tetrahidrofurano) e diclorometano.

Se o contrário se verificar tratar-se de uma Cromatografia de Fase Inversa (Figura 6) e os solventes utilizados na fase móvel são acetonitrilo, metanol, isopropanol, etanol, acetona e água. As fases estacionárias podem ser hidrocarbonetos (cadeias lineares e de cadeias fechadas apolares – geralmente C18) [15].

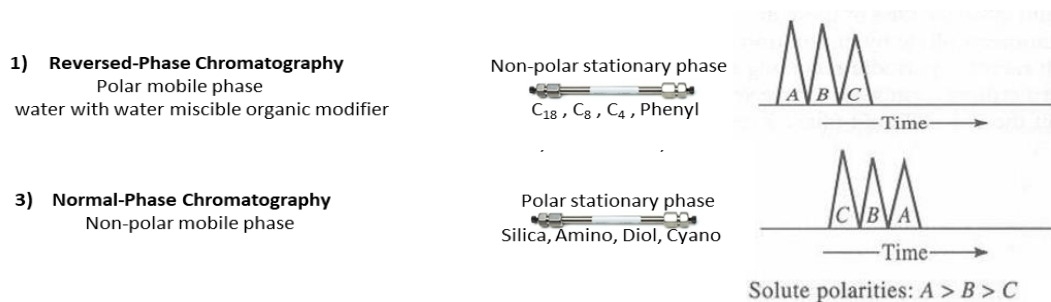


Figura 6 – Cromatogramas com ordem dos tempos de retenção para cada tipo de cromatografia [15]

Existe dois tipos de eluição cromatográfica neste tipo de cromatografia, a eluição isocrática e em gradiente. A isocrática utiliza uma composição constante da fase móvel durante toda a análise cromatográfica. Esta composição constante de fase móvel proporciona um equilíbrio nas condições da coluna e da velocidade da fase móvel. Por esse motivo, a eluição isocrática apresenta uma baixa capacidade de gerar picos no cromatograma resultantes da alteração da composição [16].

A eluição por gradiente utiliza pelo menos dois solventes diferentes. A composição da fase móvel varia ao longo da análise cromatográfica. Este tipo de eluição em gradiente, aplica-se em amostras mais complexas porque permite obter todos os componentes separados e aumenta o poder de separação, diminuindo a largura dos picos. Quanto mais acentuado for o gradiente, maior é o desequilíbrio entre as condições de separação. De referir que quanto mais tempo os componentes forem retidos na coluna mais largo e mais baixo é o pico resultante, como se pode perceber na seção seguinte [16].

2.6.1.1. PARÂMETROS DA CROMATOGRAFIA

De modo a perceber como é que se constroem métodos cromatográficos para separar eficientemente os constituintes de uma dada amostra, apresentam-se os parâmetros de uma dada cromatografia.

a) Prato teórico ou eficiência da cromatografia

O modelo do prato teórico pressupõe que a coluna cromatográfica contém um determinado número de camadas separadas designados por pratos teóricos. As colunas com números altos de pratos são mais eficientes na separação de compostos semelhantes do ponto de vista da polaridade, Figura 7 [17].

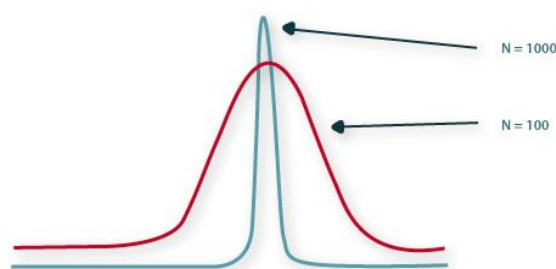


Figura 7 - Influência de N na resposta da coluna cromatográfica [17]

Uma coluna com um valor de número de pratos alto terá picos no cromatograma mais estreitos, com um determinado tempo de retenção bem definidos, do que uma coluna com um número de pratos mais baixo resultando numa separação mais eficiente [17].

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_r}{W_b} \right)^2 \quad N = 5.54 \cdot \left(\frac{t_r}{W_{1/2}} \right)^2$$

Figura 8 - Fórmula do modelo do prato teórico. A fórmula da direita é referente aos picos Gaussianos [17].

onde t_r é o tempo de retenção, W é a largura do pico na base e $W_{1/2}$ é a largura do pico a meia altura

b) Tempo de retenção

O tempo de retenção, Figura 9, mede o período de tempo que um dado analito da amostra demora a percorrer a fase estacionária até chegar ao detetor. Este tempo corresponde à posição do máximo da adsorção a um dado comprimento de onda do pico no cromatograma. Um desvio no tempo de retenção pode indicar a existência de um problema com o sistema, ou alteração na composição da fase móvel ou fluxo. As farmacopeias permitem algumas alterações nas condições cromatográficas para ajustar o tempo de retenção [17].

$$t_R = t_0 \left(1 + \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \cdot K \right)$$

$$t_0 = \frac{V_S}{Q} \varepsilon$$

t_R : tempo de retenção do soluto
 t_0 : tempo de retenção da fase móvel
 ε : fração de vazio
 K : coeficiente de distribuição

V_S : volume de fase estacionária ou da coluna (m^3)
 Q : caudal de fase móvel (m^3/s)

Figura 9 - Equação do tempo de retenção de um componente da amostra [18]

c) Seletividade de separação de constituintes

A seletividade (α) é uma medida de tempo ou distância entre os valores máximos de dois picos no cromatograma. Este parâmetro mede a capacidade que a coluna tem de separar dois componentes com tempos de retenção semelhante. Se $\alpha = 1$, os dois picos têm o mesmo tempo de retenção e eluição, logo a separação não é eficiente. Se $\alpha > 1$ a separação entre os picos do cromatograma é maior [17] [18].

Na Figura 10, encontra-se a equação que define a seletividade, em que k designa o fator de retenção que é a medida da capacidade da coluna em reter um componente da amostra, ou seja, é a medida de retenção de um analito na fase estacionária [17].

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$$

α Seletividade
 k_1 Fator de retenção do 1º pico
 k_{2i} Fator de retenção do 2º pico

Figura 10 – Equação que exprime a seletividade [17]

Numa corrida cromatográfica de uma amostra com dois analitos.

Este parâmetro é mais usado na cromatografia preparativa que na cromatografia analítica.

d) Resolução da separação entre componentes consecutivos

Mede o grau de separação entre 2 componentes com tempo de retenção semelhantes, Figura 11, contabilizando também a largura dos picos (W). Um valor de 1 é o mínimo para uma quantificação adequada, o ideal é ser superior a 1,5 para que dois compostos sejam totalmente separados [17].

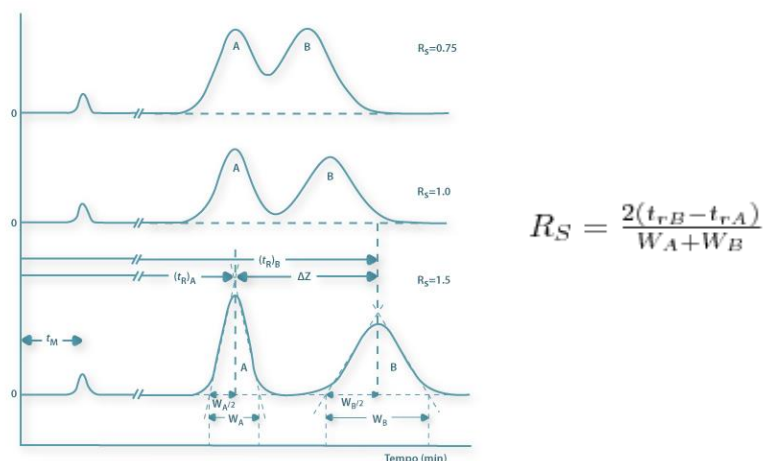


Figura 11 - Relação entre largura do pico e separação. O efeito da resolução no grau de separação dos picos está ilustrado na Figura. Para $R_S = 1.5$, a separação é praticamente completa [17]

t_r – tempo de retenção, W – largura do pico na base

e) Fator de simetria

Um fator de simetria (A_s) de 1,0 corresponde a uma simetria ideal de um pico no cromatograma e pode ser calculado através da fórmula, Figura 12:

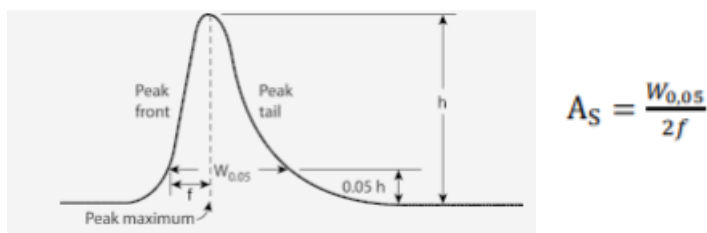


Figura 12 - Fórmula do fator de simetria

onde $w_{0,05}$ = largura do pico a uma altura de 5% e f = distância do pico da linha central ao início do pico. Segundo a Farmacopeia Europeia, o valor de 1,0 significa a simetria ideal de um pico. Picos com simetrias muito baixas ou altas dificultam a determinação das suas áreas e, conseqüentemente, a quantificação do analito [19].

f) Razão peak-to-valley (p/v)

A razão peak-to-valley pode ser usada no ensaio das substâncias relacionadas quando a separação da linha de base entre dois picos não é conseguida, ou seja, quando os picos estão muito juntos. Este parâmetro é calculado pela fórmula que está indicada na Figura 13 [20].

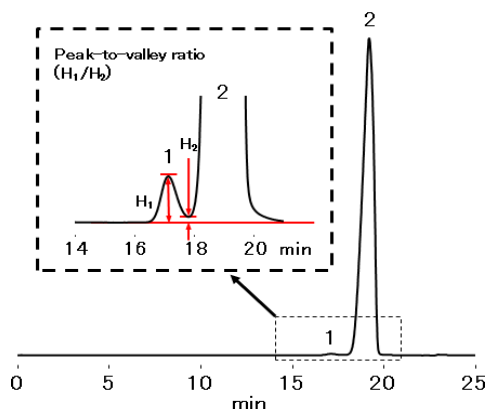


Figura 13 - Razão peak-to-valley [20]

Sendo H_1 (ou H_p) a altura desde a linha de base do pico menor e H_2 (ou H_v) a altura a partir da linha de base até ao ponto que separa o pico menor do maior [20].

Quando os picos estão bem resolvidos segundo este parâmetro o H_v é zero.

Se a posição do pico mais pequeno for após o pico maior o valor também pode ser valley to peak (v/p).

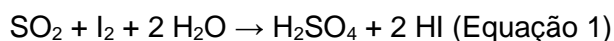
g) Limite de quantificação (LOQ)

O limite de quantificação é definido como a concentração mais baixa numa amostra de um dado componente, que pode ser medida com um nível aceitável de exatidão e precisão. [20].

O LOQ das substâncias é definido na Farmacopeia Europeia (Ph. Eur.) e é avaliado para as várias impurezas conhecidas e desconhecidas de um API.

2.6.2. TITULAÇÃO KARL-FISCHER

A titulação Karl Fischer é o método padrão específico para a determinação do teor de água e fornece resultados exatos e precisos em minutos. No ano de 1935 um cientista alemão Karl Fischer publicou este método titulométrico baseado na reação de Bunsen usado para determinação de dióxido de enxofre em soluções aquosas (Equação 1) [21]:



O cientista descobriu que, se o dióxido de enxofre fosse adicionado em excesso, a mesma reação podia ser usada para a determinação da água presente, por titulação dos ácidos produzidos. Nos anos seguintes houve melhoria desta reação pois Fischer tinha apresentado a razão molar incorreta assumindo que o metanol funcionava como solvente nesta reação. O erro foi corrigido por Smith, Bryant e Mitchell originando a reação que é usada atualmente (Equação 2) [21]:



Inicialmente esta titulação era realizada manualmente e o ponto final era detetado pela persistência da cor do excesso de iodo adicionado. Desta forma a titulação tornava-se lenta e desadequada para amostras coloridas. Hoje em dia, a titulação Karl Fischer é automatizada e amplamente utilizada para determinação de água em vários setores [21].

2.6.2.1. TÉCNICA DE TITULAÇÃO KARL FISCHER

Existem duas técnicas diferentes para a determinação de água por Karl Fischer, a titulação volumétrica e a coulométrica. A titulação usada pela discente neste estágio foi a volumétrica.

- **Titulação Karl Fischer volumétrica (Figura 14)** - a determinação é adequada para a determinação do teor de água em amostras até 1% (m/m) de água. A amostra é dissolvida em solvente Karl Fischer (geralmente à base de metanol) e o iodo é adicionado como parte de um reagente Karl Fischer contendo dióxido de enxofre e iodo dissolvido em piridina e metanol. O ponto final é determinado potenciometricamente [21].

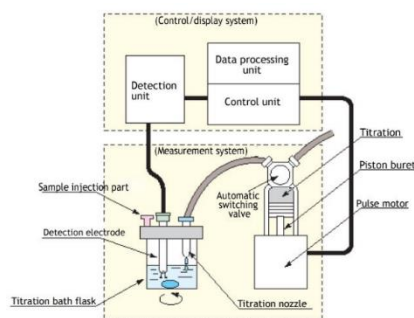


Figura 14 - Titulação Karl Fischer volumétrica [21]

Em ambas as técnicas, a amostra é transferida para o recipiente de titulação, dissolvida e titulada [21].

A equação usada pelo software é a representada a seguir (Equação3):

$$\text{Water content (\%)} = \frac{\text{volume de reagente consumido (ml)} \cdot \text{fator de água equivalente do reagente} \cdot 100}{\text{peso de amostra (mg)}} \text{ (Equação3)}$$

2.6.3. TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA

A potenciometria é um método de determinação da concentração de soluto numa determinada solução medindo a diferença de potencial entre dois elétrodos. A titulação mede o potencial do eletrodo indicador e do eletrodo de referência fornecendo resultados mais exatos e precisos em relação à titulação manual. É por isso que a titulação potenciométrica é preferível às titulações manuais [22].

O eletrodo indicador e o eletrodo de referência são imersos na mesma solução. O eletrodo de referência é o eletrodo que mantém o potencial e permanece estável enquanto o eletrodo indicador é o eletrodo que responde à variação no potencial [22].

Quando a titulação se aproxima do ponto de equivalência, pequenas mudanças surgem e a maior mudança detectada no potencial do eletrodo indicador é considerada o ponto final da titulação [22].

O ponto final da titulação pode ser observado num gráfico de potencial versus volume de titulante (Figura 15), e é expresso como o volume correspondente de titulante [22].

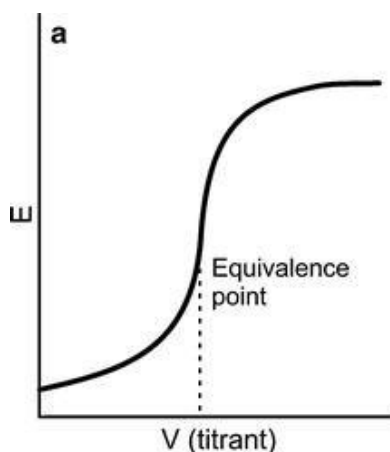


Figura 15 - Gráfico de potencial versus volume de titulante [21]

3. METODOLOGIA

No laboratório de CQ são seguidos procedimentos internos, bem como os procedimentos da Farmacopeia Europeia (Anexo 1). Neste capítulo serão apresentados os procedimentos seguidos pela farmacopeia europeia.

Na farmacopeia, as monografias estão organizadas da seguinte forma:

- a) Títulos – Estão em inglês ou francês
- b) Massas atômicas e moleculares relativas – Estão no início da monografia juntamente com as fórmulas moleculares do composto
- c) Definição – definição oficial da substância, preparação ou outro artigo onde é assunto na monografia
- d) Caracterização – Ensaio de solubilidade e aparência do composto
- e) Identificação – Estes ensaios não são projetados para fornecer uma confirmação completa da estrutura química ou composição do produto, destinam-se apenas a confirmar a conformidade com a descrição na etiqueta. Certas monografias têm subdivisões intituladas “Primeira identificação” e “Segunda identificação”. Neste tópico são pedidos identificação por infravermelho (IV) e percentagem de água.
- f) Testes e ensaios – Restantes ensaios, tais como HPLC, doseamento por potenciometria, teor de cloretos e sulfatos, etc...

3.1 ENSAIO DA APARÊNCIA (MONOGRAFIA 2.2.2.)

Na monografia do produto está descrito qual a solução referência (Anexo 2) a usar para comparação com o produto em causa, mas em alguns casos é pedido para preparar uma solução S com o nosso produto para ser possível comparar com a solução de referência. Estava ainda indicado na monografia qual dos métodos se deveria usar.

A solução só é considerada incolor se tiver a aparência da água ou do solvente utilizado na preparação da solução a examinar, ou se a cor não for mais intensa do que a solução de referência. Para realizar este tipo de ensaio pode usar-se dois métodos - método I e método II apresentado na monografia da farmacopeia.

3.2 ENSAIO DE SOLUBILIDADE (MONOGRAFIA 1.4.)

Neste ensaio é pedido para dissolver a nossa amostra em determinados reagentes (por norma são: água, metanol, etanol, acetonitrilo e diclorometano) e está descrito qual o resultado a obter para estar conforme.

Nas afirmações de solubilidade os termos utilizados têm os seguintes significados que estão definidos numa tabela como a da Tabela 2, tendo por referência uma temperatura entre 15°C e 25°C.

Tabela 2 - Significados de cada termo usado no ensaio da solubilidade (Monografia 1.4.)

Termo descritivo	Volume aproximado de solvente em mililitros por grama de soluto
Muito solúvel	Menos de 1
Facilmente solúvel	De 1 a 10
Solúvel	De 10 a 30
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100
Pouco solúvel	De 100 a 1000
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10000
Praticamente insolúvel	Mais do que 10000

3.3 ENSAIO ESPETROSCOPIA INFRAVERMELHO (MONOGRAFIA 2.2.24.)

A espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV) é baseada na interação da radiação infravermelha com a matéria. Como resultado da interação entre uma molécula e a radiação IV, a absorção de frequências específicas para aquela molécula pode ocorrer, e algumas vibrações intermoleculares e intramoleculares podem ser excitadas para níveis vibracionais mais elevados (Monografia 2.2.24.).

Espetroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier permite obter os espectros numa só medição.

As medições de infravermelho corresponde a 2 modos de medição principais, transmissão e reflexão total atenuada (ATR).

O modo de transmissão é baseado na capacidade da amostra de transmitir radiação IV num determinado comprimento de onda.

O modo ATR é baseado no fenómeno de reflexão interna total. A amostra é colocada em contacto com um cristal e um feixe de luz IV é passado através do cristal. Quando o ângulo entre o feixe incidente e a interface amostra-cristal excede um valor crítico, teoricamente toda a radiação é refletida. No entanto, é produzida uma onda passageira que penetra ligeiramente

na amostra e parte da energia é absorvida. A reflexão total é atenuada e permite gerar um espectro de absorção (Monografia 2.2.24.).

Os espectrofotômetros de infravermelhos tem a capacidade de registrar espectros na região dos 4000 até 650 cm^{-1} ou em alguns casos até 200 cm^{-1} , com uma fonte de luz adequada e um detetor.



Figura 17 - Espectrofotômetro FT-IR modo ATR [25]



Figura 16 - Espectrofotômetro FT-IR modo transmissão [25]

Preparação e apresentação de amostras:

Tabela 3 - Preparação das amostras nos dois métodos de espectroscopia de IV

Método do brometo de potássio (KBr)	ATR
Sólidos dispersos num sólido (discos): Triturou-se 1-2 mg de amostra e misturou-se com 300-400 mg de brometo de potássio seco, espalhou-se uniformemente no molde e aplicou-se pressão, Figura 16.	Líquidos: Colocou-se a amostra em contato com o cristal Sólidos: Assegurou-se o contacto próximo e uniforme entre a amostra e toda a superfície do cristal e aplicou-se pressão, Figura 17.

Para fazer a identificação comparou-se o espectro da amostra com o espectro da substância química de referência (CRS) da Ph.Eur. Esta comparação é feita pelo cálculo do coeficiente de correlação entre os 2 espectros – o valor é calculado pelo software e o limite mínimo de identificação (0.95) foi inserido no software.

Nos casos em que não existe uma substância química de referência (CRS) mas sim um espectro de referência a comparação é visual baseada em posições das bandas e intensidades relativas.

As farmacopeias não definem o limite de identificação apenas descrevem que os espectros do padrão e da amostra tem que ser visualmente comparáveis. Como tal, o limite poderá ser ajustado caso a caso.

3.4 ENSAIO PERDA POR SECAGEM/LOSS ON DRYING (MONOGRAFIA 2.2.32.)

A perda por secagem é a perda de massa expressa em percentagem mássica m/m.

Método:

Mediu-se a massa de uma quantidade prescrita da amostra para uma caixa de vidro com tampa e levou-se à estufa. Secou-se a amostra até a uma massa constante. Em alguns casos a monografia indica o tempo de secagem e nessas situações seca-se na estufa durante esse tempo, arrefece-se no exsicador durante uma hora e mede-se a massa novamente. Quando não indicam tempo, este processo é repetido até se obter uma massa constante e deve-se proceder da seguinte forma:

1. Inicia-se a secagem em estufa durante aproximadamente 3 horas à temperatura definida
2. Arrefece-se 1 hora em exsicador
3. Mede-se a sua massa
4. Volta-se a secar durante 1 hora, arrefece-se mais 1 hora, num exsicador e mede-se a massa novamente, verificando se já se obteve uma massa constante. Se isso não se verificar continua-se o ciclo de 1h em estufa e 1h em exsicador até a massa ser constante.

Quando a temperatura de secagem é indicada por um único valor em vez de uma gama, a secagem é realizada à temperatura prescrita $\pm 2^{\circ}\text{C}$. Com a secagem há perda de água e solventes que façam parte da composição da amostra.

3.5 TITULAÇÃO KARL FISCHER (MONOGRAFIA 2.5.12.)

A titulação por karl-fischer é realizada de acordo com a monografia, tendo em conta as instruções do fornecedor do instrumento e tendo todo o cuidado para evitar a exposição de reagentes e solventes à humidade atmosférica durante a determinação da humidade de água na amostra. O ponto final da titulação é determinado usando o elétrodo conectado a uma fonte elétrica que mantém uma corrente constante ou uma voltagem constante. A adição de titulante, reagente karl fischer, provoca uma redução na tensão ou um aumento na corrente e a tensão é mantida constante, até que o ponto final seja atingido.

Método:

Introduziu-se no recipiente de titulação o metanol, ou o solvente indicado na monografia. Mediu-se a quantidade prescrita de amostra, introduziu-se rapidamente a amostra a ser examinada no recipiente de titulação e efetuou-se a titulação.



Figura 18 - Equipamento de titulação de Karl-Fischer [26]

O aparelho Figura 18 consiste num recipiente de titulação com:

- 1 eletrodo platina;
- entradas para introdução de solvente e titulante;
- uma entrada de amostra equipada com uma rolha para evitar perdas de água.

3.6 ENSAIO CINZAS TOTAIS (MONOGRAFIA 2.4.16.)

Objetivo é obter a percentagem da quantidade de impurezas inorgânicas que existem na nossa amostra.

Método:

1. Aqueceu-se um cadinho de sílica ou platina por 30 min a 600°C e deixou-se arrefecer num exsiccador.
2. Após estar arrefecido mediu-se a massa do cadinho e distribuiu-se uniformemente 1,00 g da amostra no cadinho.
3. Secou-se de 100°C a 105°C durante 1 hora
4. Queimou-se numa mufla a 600°C \pm 25°C até massa constante
5. Voltou-se a arrefecer o cadinho após cada ignição e mediu-se a massa.

3.7 ENSAIO CINZAS SULFÚRICAS (MONOGRAFIA 2.4.14.)

Objetivo é obter a percentagem da quantidade de impurezas inorgânicas que existem na nossa amostra.

Método:

1. Aqueceu-se um cadinho de sílica ou platina a $600 \pm 50^{\circ}\text{C}$ por 30 min e deixou-se arrefecer num exsiccador.
2. Após estar arrefecido pesou-se o cadinho, colocou-se no cadinho a quantidade prescrita da amostra e mediu-se a massa.
3. Humedeceu-se a amostra com uma pequena quantidade de ácido sulfúrico (1mL)
4. Aqueceu-se suavemente na temperatura mais baixa possível até que a amostra estivesse completamente carbonizada.
5. Inflamou-se numa mufla a $600^{\circ}\text{C} \pm 50^{\circ}\text{C}$ até que o resíduo estivesse completamente incinerado.
6. Após estar arrefecido mediu-se a massa do cadinho novamente e calculou-se a percentagem de resíduo
7. Se a quantidade de resíduo obtida ultrapassasse o limite prescrito, repetia-se o humedecimento com ácido sulfúrico e a ignição, como anteriormente descrito, por períodos de 30 min até que 2 medições de massa consecutivas não diferissem mais de 0,5 mg ou até que o percentual de resíduo atendesse o limite prescrito.

3.8 SULFATOS (MONOGRAFIA 2.4.13.)

Método:

Adicionou-se 3 mL de uma solução de 250 g / L de cloreto de bário a 4,5 mL de solução padrão de sulfato (10 ppm SO_4). Agitou-se e deixou-se repousar por 1 min. A 2,5 mL desta solução, adicionou-se 15 mL da amostra e 0,5 mL de ácido acético (30g/100ml).

A 15 mL da solução padrão de sulfato (10 ppm SO_4) adicionou-se 2,5 mL da solução inicial e 0,5 mL de ácido acético. Após 5 min, a opalescência do padrão é mais intensa que a opalescência na solução de teste.

3.9 CLORETOS (MONOGRAFIA 2.4.4.)

Método:

Num tubo de ensaio (tubo da amostra) colocou-se 15 mL da solução amostra e 1 mL de ácido nítrico diluído (20g/100ml). Noutro tubo (tubo padrão inicial) colocou-se 10 mL de solução padrão de cloreto (5 ppm Cl), 5 mL de água e 1 mL de ácido nítrico diluído (20g/100ml).

Cada mistura (descrita em cima), foi adicionada numa única adição noutros dois tubos de ensaio (tubo da amostra final e tubo de padrão final) contendo 1 mL de solução de nitrato de prata.

Depois de permanecer por 5 min protegido da luz, examinou-se os tubos lateralmente contra um fundo preto e a opalescência do padrão é mais intensa que a opalescência na solução de teste.

3.10 ENSAIO DE DOSEAMENTO POR POTENCIOMETRIA (MONOGRAFIA 2.2.20.)

Na titulação potenciométrica (titulação volumétrica com determinação do ponto final potenciométrico), o ponto final é determinado registando a variação da diferença de potencial entre 2 elétrodo (ou um elétrodo combinado) imersos na solução para ser examinado em função do volume de titulante adicionado.

O equipamento usado é o que está na Figura 19 e consiste num titulador com uma unidade de bureta incorporada, um software (“tiamo”) de titulação, agitador magnético e um elétrodo de vidro de pH combinado.



Figura 19 - Equipamento de potenciometria por titulação [26]

Método:

Preparou-se a solução de amostra conforme o que é pedido na farmacopeia. Adicionou-se o titulante em volumes adequados, prestando atenção especial à taxa de adição próximo ao ponto final. Continuou-se a titulação além deste ponto para permitir uma deteção clara do ponto final. Esta adição e o controlo dos volumes foi feito automaticamente pelo software de titulação tiamo. Os titulantes mais usados foram o ácido perclórico e o hidróxido de sódio.

O ponto final da titulação é alcançado quando a mudança máxima no potencial. Essa mudança é representada num gráfico de potencial *versus* volume de titulante, e é expresso como o volume correspondente de titulante.

3.11 ENSAIO DE HPLC (MONOGRAFIA 2.2.29.)

A cromatografia líquida é um método de separação cromatográfica baseado na diferença da distribuição das espécies (analitos) numa dada amostra, entre duas fases não miscíveis, em que a fase móvel é um líquido que se infiltra na fase estacionária contida na coluna cromatográfica.

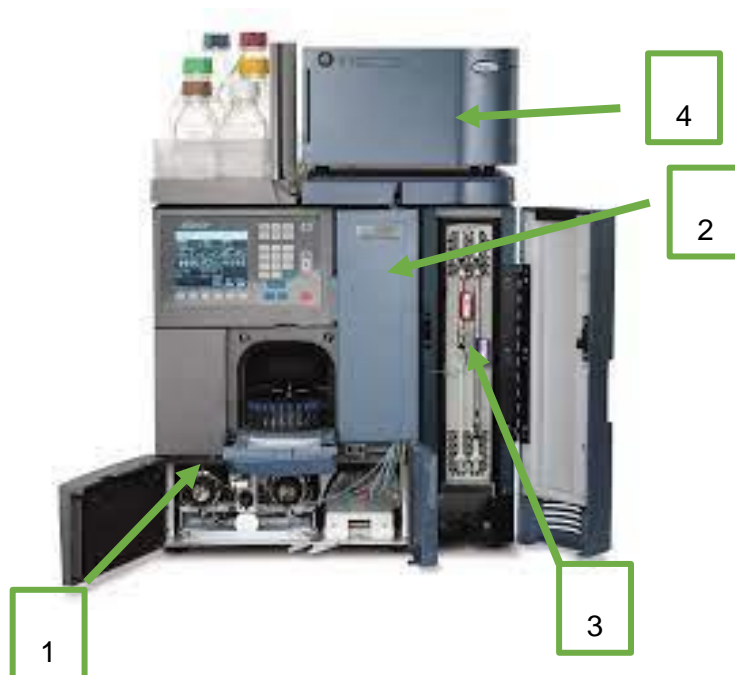


Figura 20 - Equipamento de HPLC legendado [27]

O equipamento, *Figura 20*, normalmente consiste em:

1. Num sistema de bombeamento
2. Num injetor de amostra
3. Numa coluna cromatográfica (pode ser usado o controlador de temperatura da coluna)
4. 1 ou mais detectores (UV; condutividade. . .)
5. Num sistema de aquisição de dados.

Os sistemas de bombeamento são necessários para fornecer a fase móvel a um fluxo constante e as flutuações de pressão devem ser minimizadas. A menos que de outra forma prescrito na monografia, colunas feitas de aço inoxidável de comprimento e diâmetro interno

variados são usadas para cromatografia analítica. A temperatura da fase móvel e da coluna deve ser mantida constante durante a análise. A temperatura da coluna é especificada na monografia para desempenho ideal, mas a maioria das separações é realizada a 20-25°C.

De seguida será descrito o procedimento de cromatografia líquida que foi seguido para fazer o ensaio de substâncias relacionadas de um princípio ativo.

Preparação das soluções:

Solução amostra: dissolver 50mg de amostra em fase móvel e diluir para 50mL com fase móvel.

Solução de adequação do sistema (SST/system suitability): dissolver 5mg do padrão da impureza A e 5mg do padrão da impureza B em 5mL de solução amostra e diluir para 100mL com fase móvel.

Solução de padrões (Pd1/Pd2): diluir 1mL da solução de SST para 50 mL com fase móvel.

O SST permite avaliar o sistema cromatográfico e a monografia requer uma resolução com mínimo de 2 entre os picos da impureza B e o princípio ativo.

Preparação do seal wash:

Misturou-se 900mL de H₂O com 100mL de acetonitrilo. Esta solução serve para ajuda a aumentar o desempenho e a vida útil do retentor (seal) do pistão.

Tabela 4 - Condições cromatográficas necessárias ao ensaio

Coluna HPLC	C18, diâmetro 4.6mm, comprimento 0.15m e 5µm
Fase móvel	Mistura na proporção de 350ml de acetonitrilo e 650ml da solução tampão. Solução tampão: 5.23g/L de hidrogenofosfato dipotássio ajustado a um pH de 7,0 com ácido fosfórico
Fluxo	1,2 mL/min
Temperatura da coluna	40°C
Deteção (UV)	220nm
Volume de injeção	10µL
Tempo de corrida	3 vezes o tempo de retenção do princípio ativo

Temperatura da amostra	10°C
Gradiente	Isocrático

Limites:

As impurezas A e B vão ser avaliadas sem curva do API como comparação. Enquanto as impurezas desconhecidas terão como curva de referência o princípio ativo. Isto vai permitir ao software calcular o teor de cada impureza.

A monografia estabelecia que o LOQ tinha de ser no máximo 0.05%.

Após preparação das soluções procedeu-se à limpeza das linhas do equipamento (linha A – H₂O, linha B – metanol, linha C – acetonitrilo).

Como a maioria das colunas usadas ficam acondicionadas em acetonitrilo colocou-se 100% de acetonitrilo na linha C com fluxo baixo e fez-se aumento gradual de fluxo até fluxo de trabalho (1,2 mL/min), garantindo que não havia fugas. De seguida fez-se a proporção de acetonitrilo com água até chegar à proporção da fase móvel (35:65, acetonitrilo:solução tampão).

Quando a pressão estabilizou parou-se o fluxo e trocou-se a linha A para fase móvel. De seguida purgou-se a linha A com fase móvel, fez-se o sealwash (verificando-se as bombas) e procedeu-se à lavagem da agulha que recolhe a amostra (needlewash). Repetiu-se novamente o aumento gradual de fluxo até 1,2 mL/min e purgou-se o injetor.

Após a preparação do equipamento criou-se o método com as condições cromatográficas da monografia e criou-se a sample set com a ordem de injeção dos *vials*:

- 1 injeção de SST teste, para verificar o sistema
- 3 injeções de Branco (solvente usado nas preparações que neste caso é a fase móvel)
- 1 injeção de SST
- 1 injeção de branco
- 1 injeção de Pd2 (Padrão)
- 1 injeção de Pd1 (Padrão)
- 5 injeções de Pd2 (reta de calibração)
- 1 injeção de amostra
- 1 injeção de branco (pois a amostra é mais concentrada que o Pd2)
- 1 injeção de Pd2 (Padrão de recuperação)

O SST teste serviu para verificar se o sistema estava pronto para a corrida. Se não estivesse conforme teria que se perceber o que estava a destabilizar o sistema.

Em cada linha da sample set definiu-se o volume de injeção e tempo de corrida.

4. ANÁLISE E TRATAMENTO DE DADOS

Neste capítulo serão apresentados alguns dos resultados conformes e não conformes dos ensaios de espectroscopia infravermelhos e da cromatografia líquida de elevado desempenho (HPLC) e será feito o tratamento dos mesmos.

1.1. ENSAIO ESPETROSCOPIA INFRAVERMELHO

Na figura seguinte (Figura 21) está representado o espectro de uma amostra obtido do método ATR com um resultado “não conforme”.

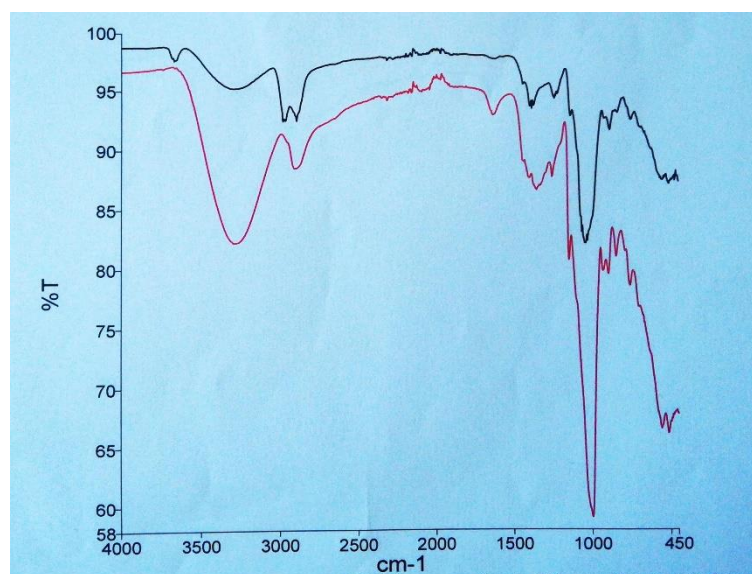


Figura 21 - Espectro NIR com resultado não conforme obtido do método ATR

Como já foi explicado no capítulo da metodologia, a identificação é feita por comparação do espectro da amostra com o espectro da substância química de referência (CRS) da Ph.Eur., e esta comparação é feita pelo software que calcula o coeficiente de correlação entre os dois espectros. O limite mínimo de identificação do coeficiente é 0.95.

Neste espectro o valor da correlação obtido foi 0.644683 o que está muito abaixo do limite de identificação. As principais diferenças espectrais, observada na Figura 21, foram detetadas nas regiões dos picos iniciais (banda dos 2500 até aos 4000 cm^{-1}) é visível uma

não conformidade dos picos da amostra (linha escura) comparados com os picos do padrão (linha vermelha).

Esta não conformidade dos picos pode ter sido originada por aumento da quantidade de água presente na amostra, que pode ser confirmada pela diferença espectral na região dos picos principais, como tal procedeu-se à secagem da amostra na estufa a 105°C durante 1 hora. Após arrefecimento durante 1 hora no excicador procedeu-se a uma nova leitura da amostra. Obteu-se assim o espectro apresentado na Figura 22.

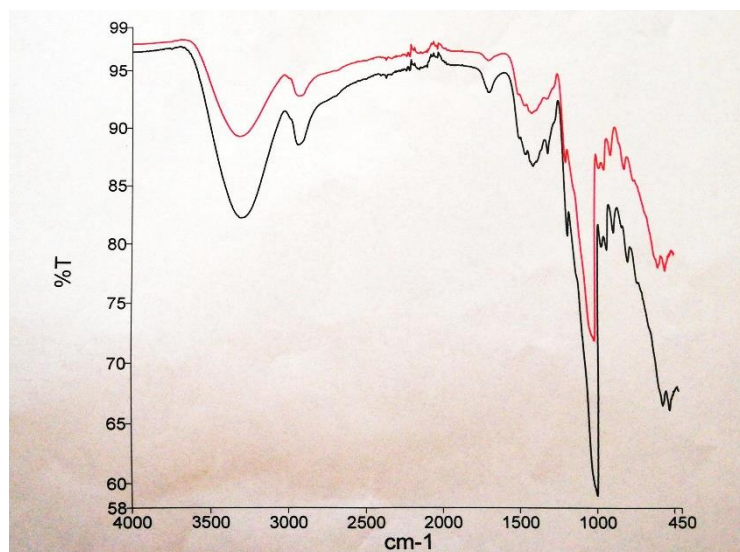


Figura 22 - Espectro NIR com resultado conforme obtido do método ATR

Neste espectro o valor de correlação obtido foi de 0.983953 que está acima do limite mínimo de identificação sendo um valor conforme. É possível ver no espectro a semelhança entre a amostra e o padrão. De referir que a farmacopeia europeia tem uma exceção de aceitação para os espectros que apresentem um valor de correlação fora do limite de identificação, mas apresentem os picos principais semelhantes ao padrão mesmo que tenha os restantes picos diferentes.

Quando se sucede a não conformidade nos cromatogramas obtidos pelo método KBr devem passar por uma repetição da preparação do disco e em caso se haver picos na mesma zona do caso explicado acima deve proceder -se à secagem da mistura da amostra com o brometo de potássio em estufa a 105°C durante 1 hora, arrefecer e voltar a analisar.

1.2. ENSAIO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DO ELEVADO DESEMPENHO – SUBSTÂNCIAS RELACIONADAS

De seguida vão ser apresentados os resultados referentes ao procedimento de substâncias relacionadas com o descrito no capítulo da metodologia no ponto 3.11.

Após o ensaio de substâncias relacionadas por HPLC obtém-se o seguinte cromatograma, Figura 23, com os tempos de retenção das impurezas conhecidas, desconhecidas e do princípio ativo.

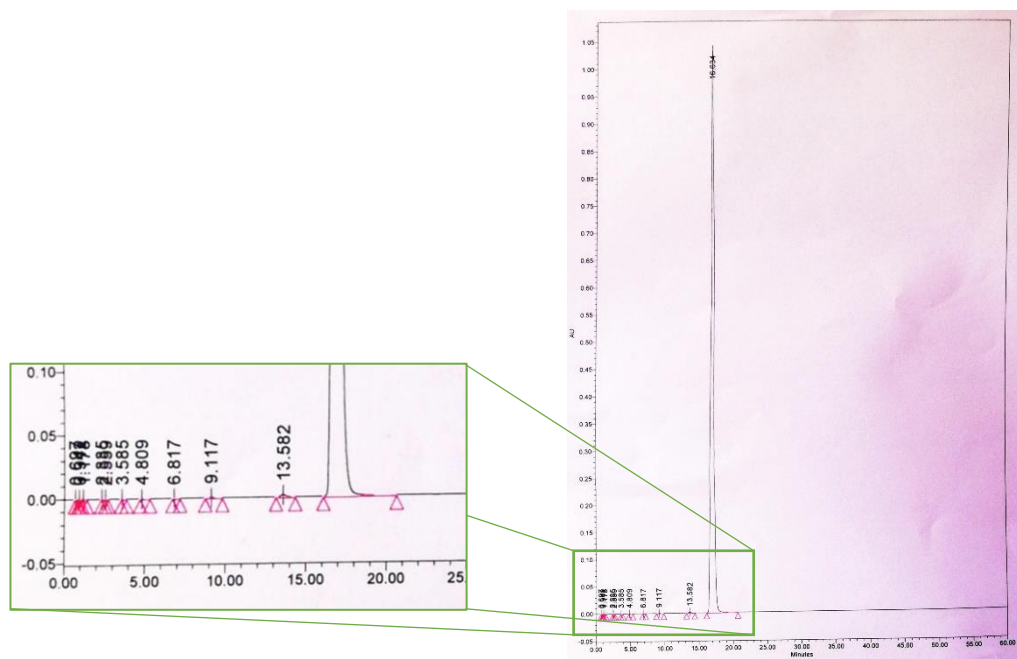


Figura 23 - Cromatograma obtido do ensaio de substâncias relacionadas do API

Os tempos de retenção do cromatograma:

Impureza desconhecida 1 – 4.809 min

Impureza desconhecida 2 – 6.817 min

Impureza desconhecida 3 – 9.117 min

Impureza B – 13.582 min

API – 16.634 min.

As linhas a vermelho são as integrações feitas pelo software que podem ser ajustadas alterando o valor dos parâmetros de integração, tais como, “Liftoff %” e “Touchdown %” que identificam o início e o fim dos picos. O “Liftoff %” é usado para o início do pico e o “Touchdown %” para o final do pico. O valor padrão é 0.000 para “Liftoff %” e 0.500 para “Touchdown %”.

O system suitability (SST) são um conjunto de critérios que os testes que vamos executar tem de cumprir e que vão indicar se o sistema cromatográfico está em condições para executar o ensaio pretendido. Neste caso tinha que apresentar uma resolução com mínimo de 2 entre o pico da impureza B e o pico do princípio ativo. O resultado de resolução obtido foi 1,68 (~2) permitindo dizer que o sistema estava conforme.

Para avaliar a preparação dos padrões é feito um cálculo da concordância entre Pd2 inicial e Pd1:

Concordância de padrões (%) = $\frac{\text{Área do Pd2 inicial} \times \text{massa do Pd1}}{\text{Área do Pd1} \times \text{massa do Pd2 inicial}} \times 100$, tem um limite de 95% a 105%.

Impureza A:

$$\text{Concordância de padrões (\%)} = \frac{22013 \times 10.87 \text{ mg}}{21607 \times 10.87 \text{ mg}} \cdot 100 = 98.2 \%$$

Impureza B:

$$\text{Concordância de padrões (\%)} = \frac{51958 \times 10.03 \text{ mg}}{51987 \times 10.03 \text{ mg}} \cdot 100 = 100.1 \%$$

Impureza API:

$$\text{Concordância de padrões (\%)} = \frac{27975 \times 50.29 \text{ mg}}{28511 \times 50.29 \text{ mg}} \cdot 100 = 101.9 \%$$

Tabela 5 - Resultados referentes à área, média e RSD obtidos na reta para cada impureza conhecida e para o API do ensaio de substâncias relacionadas

Amostra	Área	Nome	Média	RSD (Desvio Padrão Relativo)
Pd2 (Reta)	51174	Impureza B	51484	1.00
Pd2 (Reta)	51668	Impureza B		
Pd2 (Reta)	52274	Impureza B		
Pd2 (Reta)	50933	Impureza B		
Pd2 (Reta)	51371	Impureza B		

O parâmetro RSD permite avaliar a estabilidade e precisão do sistema cromatográfico. É calculado pelo desvio padrão dos valores de área obtido em cada injeção da reta a dividir

O parâmetro RSD não pode ser superior a 5

Pd2 (Reta)	22685	Impureza A	22013	2.07
Pd2 (Reta)	22254	Impureza A		
Pd2 (Reta)	21846	Impureza A		
Pd2 (Reta)	21716	Impureza A		
Pd2 (Reta)	21564	Impureza A		
Pd2 (Reta)	28292	API	28675	1.73
Pd2 (Reta)	28427	API		
Pd2 (Reta)	29517	API		
Pd2 (Reta)	28417	API		
Pd2 (Reta)	28723	API		

Tabela 6 - Resultados da recuperação do padrão de recuperação para cada impureza e API

Nome	Área	Recuperação
API	28027	97.7%
Impureza B	52184	101.4%
Impureza A	21872	99.4%

O parâmetro da recuperação tem como limite de 95% a 105%. É calculado pelo quociente entre a média da reta e a área do padrão de recuperação e multiplica-se por 100.

O parâmetro da recuperação serve para provar que as condições cromatográficas, de estabilidade e precisão, se mantiveram ao longo da corrida cromatográfica

Outro parâmetro de recuperação avaliado é a recuperação do padrão Pd2 inicial com a média da reta, entre a área do primeiro Pd2 da sample set com a média da reta. O limite é de 95% a 105%.

Impureza A

Recuperação do padrão Pd2 inicial com a média da reta = $\frac{22013}{22013} \cdot 100 = 100\%$, resultado conforme.

Impureza B

Recuperação do padrão Pd2 inicial com a média da reta = $\frac{51958}{51484} \cdot 100 = 100.9\%$, resultado conforme.

API

Recuperação do padrão Pd2 inicial com a média da reta = $\frac{27975}{28675} \cdot 100 = 97.6\%$, resultado conforme.

O parâmetro LOQ deve ser inferior a 0.05%. O LOQ é um parâmetro limite e só as impurezas com valor superior ao LOQ é que devem ser consideradas como tal. Essas impurezas devem ser quantificadas de forma a se avaliar se estão dentro ou fora de especificação. Cada impureza pode ter um limite individual ou existir um limite geral para cada pico de impureza. Existe também especificação para a soma das quantidades de todas as impurezas quantificáveis.

Tabela 7 - Valores obtidos de amount comparados com o limite do LOQ

Amostra	Nome	Resultado (%)	Limite
Amostra 1	Impureza B	0.063	Para a impureza B os valores obtidos são superiores ao LOQ logo fez-se a comparação com o limite individual. Limite: <0.1%
Amostra 2	Impureza B	0.063	
Amostra 1	Impureza desconhecida 1	0.005	Para as restantes impurezas desconhecidas o valor obtido é inferior ao LOQ (<0.05%)
Amostra 2	Impureza desconhecida 1	0.005	
Amostra 1	Impureza desconhecida 2	0.002	
Amostra 1	Impureza desconhecida 3	0.009	
Amostra 2	Impureza desconhecida 3	0.009	

A impureza B não foi detetada.

O total de impurezas é 0.063%, só se quantificas as impurezas superiores ao LOQ.

1.2.1. ENSAIO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DO ELEVADO DESEMPENHO – DOSEAMENTO

De seguida vai ser apresentado resultados de doseamento de uma outra amostra analisada durante o estágio para demonstração do procedimento a seguir em caso de resultado não conforme.

No doseamento os limites são diferentes do método de substâncias relacionada e o sistema cromatográfico é avaliado pela concordância entre padrões e pelo parâmetro de recuperação.

Para doseamento a sample set criada é:

- 3 injeções de Branco para estabilização do sistema (solvente usado nas preparações)
- 1 injeção de Pd2 (Padrão)
- 1 injeção de Pd1 (Padrão)
- 6 injeções de Pd2 (reta de calibração)
- 1 injeção de amostra 1
- 1 injeção de amostra 2
- 1 injeção de Pd2 (Padrão de recuperação)

Tabela 8 - Média das áreas obtidas em cada injeção da reta e o RSD

Amostra	Área	Nome	Média	RSD (Desvio Padrão Relativo)
Pd2 (Reta)	2268770	API	2264325	0.11
Pd2 (Reta)	2262765	API		
Pd2 (Reta)	2264076	API		
Pd2 (Reta)	2263116	API		
Pd2 (Reta)	2265500	API		
Pd2 (Reta)	2261720	API		

O parâmetro RSD não pode ser superior a 2

Recuperação do padrão Pd2 inicial com a média da reta $= \frac{2265206}{2264325} \cdot 100 = 100.4\%$ (O parâmetro da recuperação tem como limite de 98% a 102%)

Mas neste caso não se avançou com a avaliação dos restantes parâmetros porque as amostras encontravam-se fora de especificação:

A1 – 99.025% e A2 – 102.1% sendo a especificação de 98.0% a 102.0% só a amostra A1 está conforme a especificação. Quando se sucedem situações destas o procedimento a seguir é o seguinte.

1. Cria-se nova sample set com as reinjeções dos mesmos vials da amostra controlo e da amostra que estava fora de especificação:
 - 1 injeção de branco
 - 1 injeção de Pd2
 - 3 injeção da reinjeção da amostra 1 (amostra controlo)
 - 3 injeção da reinjeção da amostra 2
 - 1 injeção do Pd2 de recuperação

O parâmetro de recuperação desta sample set foi de 100.603% que está dentro da especificação (98.0% a 102.0%).

Valores obtidos nas amostras:

Amostra A1 (amostra de controlo):

- 99.371% resultado conforme (98.0% a 102.0%)
- 99.263% resultado conforme (98.0% a 102.0%)
- 99,235% resultado conforme (98.0% a 102.0%)

Amostra A2:

- 101.966% resultado conforme (98.0% a 102.0%)
- 102.116% resultado não conforme (98.0% a 102.0%)
- 102.076% resultado não conforme (98.0% a 102.0%)

2. Como a amostra A2 continuava fora de especificação reinjetou-se o vial novo juntamente com a reinjeção da amostra controlo também de vial novo. A sample set criada foi:

- 1 injeção de branco
- 1 injeção de Pd2
- 3 injeção da reinjeção da amostra 1 (amostra controlo)
- 3 injeção da reinjeção da amostra 2
- 1 injeção do Pd2 de recuperação

O parâmetro de recuperação desta sample set foi de 100.428% que está dentro da especificação (98.0% a 102.0%).

Valores obtidos nas amostras:

Amostra A1 (amostra de controlo):

- 102.224% resultado não conforme (98.0% a 102.0%)
- 102.252% resultado não conforme (98.0% a 102.0%)
- 102.294% resultado não conforme (98.0% a 102.0%)

Amostra A2:

- 101.919% resultado conforme (98.0% a 102.0%)
- 102.057% resultado não conforme (98.0% a 102.0%)
- 101.977% resultado conforme (98.0% a 102.0%)

3. Como a amostra controlo e a amostra A2 continuava fora de especificação rediluiu-se esta amostra e a amostra controlo. A sample set criada foi:

- 1 injeção de branco
- 1 injeção de Pd2
- 2 injeção da rediluição da amostra 1 (amostra controlo)
- 2 injeção da rediluição da amostra 2
- 1 injeção do Pd2 de recuperação

O parâmetro de recuperação desta sample set foi de 98.643% que está dentro da especificação (98.0% a 102.0%).

Valores obtidos nas amostras:

Amostra A1 (amostra de controlo):

- 102.267% resultado não conforme (98.0% a 102.0%)
- 102.644% resultado não conforme (98.0% a 102.0%)

Amostra A2:

- 101.430% resultado conforme (98.0% a 102.0%)
- 101.549% resultado conforme (98.0% a 102.0%)

A amostra controlo deu acima de especificação por isso não se pode considerar os resultados conformes obtidos da amostra A2. Existiu concentração das amostras por evaporação do solvente.

Como não se obteve resultados conformes nestas três hipóteses prossegue-se com a abertura de uma OOS (Fora de especificação/Out-of-Specification) em que uma segunda analista prepara novos padrões, amostras e fase móvel.

A sample set criada é:

- 3 injeções de Branco para estabilização do sistema
- 1 injeção de Pd2 (Padrão)
- 1 injeção de Pd1 (Padrão)

- 6 injeções de Pd2 (reta de calibração)
- 2 injeção de amostra 1
- 2 injeção de amostra 2
- 1 injeção de Pd2 (Padrão de recuperação)

O parâmetro de recuperação desta sample set foi de 102.0% que está dentro da especificação (98.0% a 102.0%).

Tabela 9 - Média das áreas obtidas em cada injeção da reta e o RSD na nova sample set

Amostra	Área	Média	RSD (Desvio Padrão Relativo)
Pd2 (Reta)	2321878	2397412.83	2.93
Pd2 (Reta)	2452877		
Pd2 (Reta)	2458236		
Pd2 (Reta)	2446586		
Pd2 (Reta)	2298697		
Pd2 (Reta)	2406203		

O parâmetro RSD não pode ser superior a 2. Como se pode observar o valor obtido é superior logo não está conforme. Reinjeção da reta no final da sample set descrita em cima.

Tabela 10 - Média das áreas obtidas em cada reinjeção da reta e o RSD

Amostra	Área	Média	RSD (Desvio Padrão Relativo)
Pd2 (Reta)	2366924	2375652	0.41
Pd2 (Reta)	2376217		
Pd2 (Reta)	2391783		
Pd2 (Reta)	2375999		
Pd2 (Reta)	2364069		

Pd2 (Reta)	2378919		
-------------------	---------	--	--

Amostra A1:

- 101.127% resultado conforme (98.0% a 102.0%)
- 100.865% resultado conforme (98.0% a 102.0%)

Amostra A2:

- 101.504% resultado conforme (98.0% a 102.0%)
- 102.062% resultado não conforme (98.0% a 102.0%)

Como a segunda injeção da amostra 2 deu fora de especificação fez-se 5 reinjeções da amostra com padrão a abrir e a fechar a sample set.

Concordância do padrão de abertura: 99.869% resultado conforme (98.0% a 102.0%)

Concordância do padrão de recuperação: 99.989% resultado conforme (98.0% a 102.0%)

Amostra A2 rediluição:

- 101.419% resultado conforme (98.0% a 102.0%)
- 101.215% resultado conforme (98.0% a 102.0%)
- 101.414% resultado conforme (98.0% a 102.0%)
- 101.621% resultado conforme (98.0% a 102.0%)
- 101.373% resultado conforme (98.0% a 102.0%)

Resultados finais:

Tabela 11 - Resultados finais da OOS

Amostra	Resultado	Média Final	RSD final
A1-1ª injeção	101.127%	101.32% (98.0% a 102.0%)	0.221014 (<1%)
A1-2ª injeção	100.865%		
A2-1ª injeção	101.504%		
A2 reinjeção-1ª injeção	101.419%		
A2 reinjeção-2ª injeção	101.215%		
A2 reinjeção-3ª injeção	101.414%		
A2 reinjeção-4ª injeção	101.621%		

A2 reinjeção-5ª injeção	101.373%		
--------------------------------	----------	--	--

Com estes resultados conclui-se a conformidade da amostra e permitiu perceber que o problema não era do equipamento nem da amostra. No segundo caso existiu um material volumétrico não conforme que foi descartado.

1.1.1. Problemas associados a análises cromatográficas

a) Fase móvel:

A eluição por gradiente pode proporcionar contaminantes na fase móvel, à medida que aumenta os contaminantes a linha de base pode subir, surgir picos indesejáveis e baixa sensibilidade [19].

O ruído na linha de base ou obstrução da coluna pode ser provocado por partículas que surgem das soluções tampão. Para evitar este problema a maioria das soluções tampão tem uma percentagem de solventes orgânicos como etanol ou acetonitrilo na sua preparação [19].

Mudanças na composição da fase móvel como a evaporação de um dos componentes ou deterioração da fase móvel leva a variações nos tempos de retenção e pode ser solucionado preparando uma fase móvel nova e passando pela coluna não excedendo o volume máximo da coluna [19].

$$\text{Volume máximo da coluna } (\mu\text{L}) = \pi \times \text{raio}^2 \times \text{comprimento} \times 0,01$$

No caso de uma coluna de 2,1 mm x 5 cm:

$$V = \pi \cdot r^2 \cdot L = \pi \cdot (2,1/2)^2 \cdot 50 = 173 \text{ mm}^3 \text{ volume da coluna}$$

$$V_{\text{max}} = 0,01 \times 173 = 1,7 \text{ mm}^3 = 1,7 \mu\text{L}$$

Volume máximo de injeção deve ser < 1% do volume interno da coluna vazia.

b) Injetor e solventes injetados:

O injetor introduz rapidamente a amostra no sistema com uma variação de fluxo mínima. Os problemas mecânicos que envolvem o injetor são fáceis de detetar, tais como, alterações da altura dos picos, picos divididos ou amplos. Podem ser causados por diferença de viscosidade entre solvente e fase móvel, filtros entupidos, volume de injeção errado ou sistema de injeção contaminado [23].

c) Coluna:

Quando as pressões aumentam pode ser provocado por entupimento da coluna sendo necessário lavar a coluna. Alterações nos picos, tais como, mais pequenos e mais largos ou picos com caudas podem ser provocados pela sobrecarga da coluna (importante verificar o volume de injeção) ou degradação da coluna por pH errado ou temperatura errada [23].

5. DISCUSSÃO

O acesso a medicamentos seguros, eficazes e de qualidade permite-nos viver em sociedades mais conscientes e com melhores produtos na área da saúde. Para haver essa garantia a indústria farmacêutica tem de seguir as regras de GMP e assim apostar num sistema de gestão da qualidade.

A qualidade vai assegurar que o medicamento está conforme com as especificações inicialmente definidas, que não houve desvios e associando a qualidade à eficácia e segurança permite que os medicamentos sejam aprovados e que seja a resposta que muitos doentes necessitam.

Este estágio permitiu à discente ver de perto a importância do controlo de qualidade e por isso considera ser uma área em expansão e cada vez mais valorizada já que é aquela que dá garantias de que os medicamentos comercializados têm a qualidade necessária para poderem ser administrados e que irão surtir o efeito desejado.

Para garantir a qualidade do medicamento a validar, o controlo da qualidade recorre aos testes analíticos. Os resultados obtidos demonstraram estarem dentro dos limites de especificações.

Para as situações em que ocorrem resultados não conformes, existe um procedimento escrito que juntamente com a supervisão serve de guia para a investigação a efetuar. Essa investigação é adaptada ao tipo de erro, ao tipo de produto, ao equipamento, ao histórico de problemas com o produto, ao histórico de problemas com o equipamento e ao histórico de dificuldades apresentadas por quem executou a análise. A investigação visa fazer uma avaliação adequada ao problema e evita a repetição em série da análise até dar bem. Terá que existir uma base científica a suportar a decisão final.

Se após a realização destes ensaios continuar-se a obter resultados não conformes conclui-se que o problema é da amostra e é pedida nova amostragem à fábrica e é testada de novo. Em casos em que permaneça não conforme é feita uma reclamação ao fornecedor da matéria-prima com a emissão de um relatório de investigação.

Todas as alterações e repetições efetuadas são descritas no caderno do produto.

6. CONCLUSÃO

No contexto farmacêutico, a técnica de HPLC é muito importante, sendo indispensável na análise das matérias-primas, garantindo a sua qualidade.

Existem sempre diversos problemas associados o que implica que as pessoas que realizam estes ensaios usando o HPLC sejam capacitadas e aptas a resolver problemas técnicos do equipamento e tendo a capacidade de através dos resultados interpretar e descobrir a causa ou problema e propor soluções.

“É com os erros que se cria experiência e adquire-se conhecimento” foi a frase que a discente ouviu após a realização com pequenas falhas no ensaio de doseamento, como foi explicado no capítulo anterior, que fez iniciar uma investigação fora de especificação (OOS) mas permitiu consolidar a ideia de responsabilidade nos resultados obtidos e conhecer os procedimentos a seguir em caso de ocorrência de resultados fora de especificação (não conforme).

Com a conclusão deste estágio curricular a discente faz um balanço positivo, pois realizou as diferentes tarefas de forma ativa, aprendeu a desenvolver as capacidades de espírito crítico e após as formações dadas pelos colegas mais experientes da equipa foi-lhe dada alguma autonomia e responsabilidade para a realização das diversas tarefas, contribuindo assim para o seu desenvolvimento profissional.

Sendo uma estagiária em fase inicial de percurso foi sempre disponibilizada oportunidades para o esclarecimento de qualquer dúvida que pudesse surgir.

7. CONCLUSION

In the pharmaceutical context, the HPLC technique is very important, being indispensable in the analysis of raw materials, ensuring their quality.

This method presents some associated problems, having to be used by qualified technicians, in order to have the ability to interpret the results and discover the source of the problem, proposing solutions.

"It is with errors that experience is created, and knowledge is acquired" was the sentence that the student heard after performing the assay with minor flaws, as explained in the previous chapter, which initiated an out-of-specification (OOS) investigation but allowed her to consolidate the idea of responsibility in the results obtained and to know the procedures to follow in the event of an out-of-specification (non-compliant) result.

With the end of this curricular internship, the student makes a positive balance, as she performed the different tasks in an active manner, learned to develop critical thinking skills and after the training given by the more experienced colleagues of the team, she was given some autonomy and responsibility to perform the various tasks, thus contributing to her professional development.

As a trainee in the early stages of her career, opportunities were always available to clarify any doubts that might arise.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] “Sobre nos,” 27 Março 2021. [Online]. Available: <https://www.generis.pt/sobre-nos/>.
- [2] “Atividade comercial,” 09 Abril 2021. [Online]. Available: <https://www.generis.pt/sobre-nos/atividade-comercial/>.
- [3] “Atividade industrial,” 09 Abril 2021. [Online]. Available: <https://www.generis.pt/sobre-nos/atividade-industrial/>.
- [4] “Exportação,” 09 Abril 2021. [Online]. Available: <https://www.generis.pt/sobre-nos/exportacao/>.
- [5] EudraLex, “Good Manufacturing Practice (GMP) guidelines,” *Brussels: European Commission*, vol. Volume 4, 2012.
- [6] “Perguntas mais frequentes,” [Online]. Available: <https://www.generis.pt/faqs/>. [Acedido em 02 Maio 2021].
- [7] “Infarmed,” [Online]. Available: https://www.infarmed.pt/web/infarmed/perguntas-frequentes-area-transversal/medicamentos_uso_humano/genericos. [Acedido em 02 maio 2021].
- [8] “Matérias primas,” [Online]. Available: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/inspecao-medicamentos/materias-primas>. [Acedido em 02 Maio 2021].
- [9] “Basic Requirements for Active Substances used as Starting Materials,” *Brussels: European Commission*, 13 Agosto 2014.
- [10] J. Conceição, R. Pita, M. Cabral e M. Sousa, (2019) “The European Pharmacopoeia: an official book with fifty years,” *A Farmacopeia Europeia: um livro oficial com cinquenta anos*, p. 38.
- [11] “Council of europe,” European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM) , [Online]. Available: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-10th-edition>. [Acedido em 05 Maio 2021].


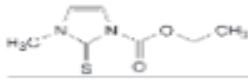
- [12] “EUPATI,” [Online]. Available: <https://toolbox.eupati.eu/resources/farmacopeia-europeia-padroes-de-qualidade-para-medicamentos/?lang=pt-pt>. [Acedido em 05 Maio 2021].
- [13] M. Thammana, (2016) “A review on high performance liquid chromatography,” *Journal of Pharmaceutical Analysis*, pp. 1-6.
- [14] A. Kumar, S. Jawla e G. Yadav, (2013) “Global journal of Pharmacology,” *Recent analytical method developed by RP-HPLC.*, pp. 232-240.
- [15] O. Mcpolin, (2009) em *An introduction to HPLC for pharmaceutical analysis.*, Mourne Training Services, , p. 148.
- [16] Y. Kazakevich e R. Lobrutto, (2007) “HPLC Theory and Practice,” em *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, New Jersey, Wiley.
- [17] C. Bortalieiro, (2016) “Fundamentos de cromatografia líquida de alto desempenho,” em *Uma ciência melhor*.
- [18] C. Coelho e G. Gomes, *Sebenta da matéria teórica de processos de Separação IIB*, Escola Superior de Tecnologia do Barreiro, Instituto Politécnico de Setúbal, 2021.
- [19] C. Reina, (2015) “A Cromatografia Líquida no Contexto Farmacêutico”.
- [20] A. Gonçalves, (2014) “Desenvolvimento e Validação de Métodos” Universidade de Coimbra.
- [21] D. Bozic, “Azo Materials,” EDITORIAL FEATURE, 31 Maio 2018. [Online]. Available: <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=16017>. [Acedido em 08 Junho 2021].
- [22] “Vedantu,” [Online]. Available: <https://www.vedantu.com/chemistry/potentiometric-titration>. [Acedido em 09 junho 2021].
- [23] “Chromservis,” Marči Horová, 1990. [Online]. Available: <https://www.chromservis.eu/c/hplc-troubleshooting>. [Acedido em 25 Junho 2021].
- [24] “KAIZEN INSTITUTE,” [Online]. Available: <https://pt.kaizen.com/competencias/melhoria-continua-planeamento-diario.html>. [Acedido em 20 maio 2021].
- [25] “Perkinelmer,” 1998. [Online]. Available: <https://www.perkinelmer.com/category/infrared-ir-instruments>. [Acedido em 02 Julho 2021].

- [26] Metrohm, “Metrohm,” 2010. [Online]. Available: <https://www.metrohm.com/pt-br/produtos-geral/titulacao/titrando/>. [Acedido em 02 Julho 2021].
- [27] Waters, “Sistemas por: tipo de instrumento,” Waters, 2021. [Online]. Available: https://www.waters.com/waters/pt_PT/Chromatography-Systems/nav.htm?cid=134774831&locale=pt_PT. [Acedido em 02 Julho 2021].

7. ANEXOS

Anexo 1

Exemplo das informações fornecidas pela farmacopeia

KEY TO MONOGRAPHS	
Carbimazole	EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.5
	Version date of the text
CARBIMAZOLE⁽¹⁾ Carbimazolum	Text reference number
	Modification to be taken into account as soon as possible and not later than the end of the month following the month of publication of Supplement 10.5
$C_7H_{10}N_4O_2S$ [22232-54-8]	Link to further information on the text (e.g. Knowledge database) for smartphones/tablets with camera and barcode reader app
M_r 186.2	CAS number
DEFINITION	Chemical name in accordance with IUPAC nomenclature rules
Ethyl 3-methyl-2-thioxo-2,3-dihydro-1H-imidazole-1-carboxylate.	For the meaning of black and white diamonds see chapter 5.8. Pharmacopoeial harmonisation
Content: 98.0 per cent to 102.0 per cent (dried substance).	Application of the first and second identification is defined in the General Notices (chapter 1)
CHARACTERS	Reference standard available from the EDQM (see https://crs.edqm.eu)
Appearance: white or yellowish-white, crystalline powder.	Reagent described in chapter 4
Solubility: slightly soluble in water, soluble in acetone and in ethanol (96 per cent). ♦	Further information on certain reagents available in the Knowledge database (https://go.edqm.eu/knowledge)
IDENTIFICATION	Vertical line in the margin indicating where the text has been modified
First identification: B.	Horizontal line in the margin indicating where part of the text has been deleted
Second identification: A, C.	Reference to a general chapter
A. Melting point (2.2.14): 122 °C to 125 °C. ◊	
B. Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).	
Preparation: discs.	
Comparison: carbimazole CRS	
C. Thin-layer chromatography (2.2.27).	
Test solution. Dissolve 10 mg of the substance to be examined in methylene chloride R and dilute to 10 mL with the same solvent.	
Reference solution. Dissolve 10 mg of carbimazole CRS in methylene chloride R and dilute to 10 mL with the same solvent.	
Plate: TLC silica gel GF ₂₅₄ plate R	
Mobile phase: acetone R, methylene chloride R (20:80 V/V).	
Application: 10 µL.	
Development: over 3/4 of the plate.	
Drying: in air for 30 min.	
Detection: examine in ultraviolet light at 254 nm.	
Results: the principal spot in the chromatogram obtained with the test solution is similar in position and size to the principal spot in the chromatogram obtained with the reference solution.	
TESTS	
Related substances. Liquid chromatography (2.2.29).	
Test solution. Dissolve 5.0 mg of the substance to be examined in 10.0 mL of a mixture of 20 volumes of acetonitrile R and 80 volumes of water R. Use this solution within 5 min of preparation.	

(1) This monograph has undergone pharmacopoeial harmonisation. See chapter 5.8. Pharmacopoeial harmonisation.

General Notices (1) apply to all monographs and other texts. See the Information section on general monographs (cover pages)

Anexo 2

Soluções de referência necessárias ao ensaio da aparência

Table 2.2.2.-1

Standard solution	Volume in millilitres			
	Yellow solution	Red solution	Blue solution	Hydrochloric acid (10 g/L HCl)
B (brown)	3.0	3.0	2.4	1.6
BY (brownish-yellow)	2.4	1.0	0.4	6.2
Y (yellow)	2.4	0.6	0.0	7.0
GY (greenish-yellow)	9.6	0.2	0.2	0.0
R (red)	1.0	2.0	0.0	7.0

Table 2.2.2.-2. - Reference solutions B

Reference solution	Volumes in millilitres	
	Standard solution B	Hydrochloric acid (10 g/L HCl)
B ₁	75.0	25.0
B ₂	50.0	50.0
B ₃	37.5	62.5
B ₄	25.0	75.0
B ₅	12.5	87.5
B ₆	5.0	95.0
B ₇	2.5	97.5
B ₈	1.5	98.5
B ₉	1.0	99.0

Table 2.2.2.-3. - Reference solutions BY

Reference solution	Volumes in millilitres	
	Standard solution BY	Hydrochloric acid (10 g/L HCl)
BY ₁	100.0	0.0
BY ₂	75.0	25.0
BY ₃	50.0	50.0
BY ₄	25.0	75.0
BY ₅	12.5	87.5
BY ₆	5.0	95.0
BY ₇	2.5	97.5

Table 2.2.2.-4. - Reference solutions Y

Reference solution	Volumes in millilitres	
	Standard solution Y	Hydrochloric acid (10 g/L HCl)
Y ₁	100.0	0.0
Y ₂	75.0	25.0
Y ₃	50.0	50.0
Y ₄	25.0	75.0
Y ₅	12.5	87.5
Y ₆	5.0	95.0
Y ₇	2.5	97.5

Table 2.2.2.-5. - Reference solutions GY

Reference solution	Volumes in millilitres	
	Standard solution GY	Hydrochloric acid (10 g/L HCl)
GY ₁	25.0	75.0
GY ₂	15.0	85.0
GY ₃	8.5	91.5
GY ₄	5.0	95.0
GY ₅	3.0	97.0
GY ₆	1.5	98.5
GY ₇	0.75	99.25

Table 2.2.2.-6. - Reference solutions R

Reference solution	Volumes in millilitres	
	Standard solution R	Hydrochloric acid (10 g/L HCl)
R ₁	100.0	0.0
R ₂	75.0	25.0
R ₃	50.0	50.0
R ₄	37.5	62.5
R ₅	25.0	75.0
R ₆	12.5	87.5
R ₇	5.0	95.0